

# Filière Technologies du vivant

## Orientation Technologie alimentaire

# Diplôme 2009

*Julie Berthouzoz*

*Validation  
des points de maîtrise  
pour la production de ketchup*

Professeur

RUDOLF SCHMITT

Expert

SÉBASTIEN DÉCOSTERD

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr <b>2008/09</b>	No TD / Nr. DA <b>ta/2009/46</b>
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input checked="" type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire	Etudiant / Student <b>Julie Berthouzoz</b>	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input checked="" type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire
Professeur / Dozent <b>Rudolf Schmitt</b>	Expert / Experte (données complètes) <b>Sébastien Decosterd</b> Reitzel (Suisse) SA   Route d'Ollon 14-16   1860 Aigle	
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja <sup>1</sup> <input checked="" type="checkbox"/> non / nein		

Titre / Titel <p style="text-align: center;"><b>Validation des points de maîtrise pour la production de ketchup</b></p>
Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele <p>L'entreprise Reitzel produit — sur son site d'Aigle — toute la gamme condimentaire : produits au vinaigre (cornichons), vinaigre, moutardes, mayonnaises, ketchup et diverses sauces. Les systèmes qualité et HACCP sont certifiés selon les normes IFS et BRC. Une révision régulière est exigée par ces normes et par la directive du Codex Alimentarius. Ce travail de diplôme consiste à une actualisation du système HACCP pour le ketchup et les sauces émulsionnées. L'accent est à mettre sur l'évaluation des dangers et la validation des opérations pour la maîtrise des dangers.</p> <p>En particulier, la mission comprend les activités suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— analyse exhaustive des dangers pour la production de ketchup selon la norme ISO 22000 :2005</li> <li>— détermination des seuils critiques du couple temps / température pour la pasteurisation du ketchup</li> <li>— validation des points critiques de contrôle des opérations.</li> </ul> <p>Si le temps le permet, la sauce de salade bio avec des herbes aromatiques est à inclure dans ce travail.</p>

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum  Resp. de la filière Leiter des Studieng.: .....  Etudiant / Student: .....	Délais / Termine [pour l'obtention du titre HES]  Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 27.04.2009  Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 11.09.2009 — 12h00  Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 04.09.2009  Défense orale / Mündliche Verfechtung: à convenir / nach Vereinbarung
--	--

<sup>1</sup> Par sa signature, l'étudiant-e s'engage à respecter strictement le caractère confidentiel du travail de diplôme qui lui est confié et des informations mises à sa disposition.  
 Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der Student, die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.

Image fournie par Reitzel (Suisse) SA



## Validation des points de maîtrise pour la production de ketchup

Diplômant/e : Julie Berthouzoz

### Objectif du projet

Ce projet consiste en une actualisation du système HACCP pour le ketchup et les sauces dressing et plus précisément en une évaluation des dangers ainsi qu'en une validation des opérations pour la maîtrise des dangers lors de la fabrication du ketchup.

### Travail de diplôme | édition 2009 |

Filière

*Technologies du vivant*

Domaine d'application

*Orientation agroalimentaire*

Professeur responsable

*Dr Schmitt Rudolf*

*rudolf.schmitt@hevs.ch*

Partenaire

*Reitzel (Suisse) SA*

HES-SO Valais

Route du Rawyl 47

1950 Sion

Tél. 027 606 85 11

URL [www.hevs.ch](http://www.hevs.ch)

### Méthodes | Expériences | Résultats

Suite à des essais de pasteurisation à l'échelle laboratoire, la température critique du procédé a pu être déterminée. Il a été décidé que la sécurité du procédé de pasteurisation est garantie avec une réduction supérieure ou égale à 6D. Il est alors possible d'assurer la sécurité alimentaire du produit, vis-à-vis des germes pathogènes, représentés par *Salmonella typhimurium*, avec un traitement de 50°C durant trois minutes car celui-ci permet une réduction de 8.0D. En revanche, un traitement de 55°C durant trois minutes est nécessaire pour obtenir une réduction supérieure à 6.2D pour *Lactobacillus plantarum* et une réduction de 6.0D pour *Zygosaccharomyces baillii*, qui évoquent les germes d'altération.

L'évolution des spores dans le ketchup a pu être suivie, pour deux souches différentes, en fonction du temps et la germination des spores peut être écartée dans le *Tomato ketchup*, en raison du faible pH ( $3.6 \pm 0.2$ ) du produit.

La maison Hugo Reitzel ne doit pas procéder à des changements majeurs dans sa méthode de production pour le ketchup et les sauces dressing. Les barèmes de pasteurisations sont satisfaisants et garantissent la sécurité du produit. Un contrôle du pH avant le conditionnement des produits devrait être effectué afin de maîtriser les germes pathogènes sporulants.

## TABLE DES MATIÈRES

1	Liste des abréviations :	6
2	Introduction.....	7
2.1	Présentation de l'entreprise Hugo Reitzel .....	7
2.2	Le ketchup .....	8
2.3	La sécurité au sein de l'entreprise Hugo Reitzel .....	8
2.4	Le concept de la norme ISO 22000:2005 .....	9
2.5	Les souches choisies pour la détermination de la température critique de pasteurisation .....	10
2.5.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> .....	11
2.5.2	<i>Salmonella spp.</i> .....	11
2.5.3	<i>Bacillus cereus</i> .....	11
2.5.4	<i>Zygosacharomyces bailii</i> .....	11
2.6	Les objectifs.....	12
3	Matériels et méthodes.....	13
3.1	Matériels .....	13
3.1.1	Souches .....	13
3.1.2	Milieus et produits .....	13
3.1.3	Equipements et appareillage .....	15
3.2	Méthodes .....	16
3.2.1	Isolation, de spores de souches sauvages, à partir du poivre blanc et du poivre de Cayenne.....	16
3.2.2	Préparation de la suspension de spores .....	16
3.2.3	Préparation des souches .....	17
3.2.4	Influence du ketchup sur la vitalité des souches .....	20
3.2.5	Suivi de l'évolution des spores et des germes végétatifs dans le ketchup.....	20
3.2.6	Déroulement des essais de pasteurisation du ketchup .....	21
3.2.7	Influence du ketchup sur l'eau peptonée tamponnée, dans les conditions du dénombrement selon la méthode du NPP .....	26
3.2.8	Détermination de la viscosité du ketchup en fonction de la température .....	26

4	Résultats.....	27
4.1	Influence du ketchup, à court terme, sur la vitalité des souches .....	27
4.2	Suivi de l'évolution des spores et de leurs germes végétatifs dans le ketchup.....	28
4.2.1	Dénombrement des différentes suspensions de spores obtenues .....	28
4.2.2	évolution des spores et de leurs germes végétatifs dans le ketchup .....	28
4.3	Pasteurisation du <i>tomato ketchup</i> .....	31
4.4	Influence du ketchup sur l'eau peptonée tamponnée, dans les conditions du dénombrement de la méthode du NPP.....	33
4.5	Détermination de la viscosité du ketchup en fonction de la température .....	34
4.6	Analyse exhaustive des dangers pour la production du <i>tomato ketchup hot</i> , selon la norme ISO 22000:2005 .....	35
4.7	Analyse exhaustive des dangers pour la production de la sauce <i>french dressing aux herbes</i> , selon la norme ISO 22000:2005 .....	43
5	Discussion.....	44
5.1	Influence du ketchup, à court terme, sur la vitalité des souches .....	44
5.2	Suivi de l'évolution des spores et de leurs germes végétatifs dans le ketchup.....	45
5.2.1	Isolation de spores de souches sauvage provenant des épices.....	45
5.2.2	Evolution des spores et de leurs germes végétatifs dans le ketchup .....	45
5.3	Pasteurisation du <i>tomato ketchup</i> .....	47
5.4	Influence du ketchup sur l'eau peptonée tamponnée, dans les conditions du dénombrement de la méthode du NPP.....	49
5.5	Détermination de la viscosité du ketchup en fonction de la température .....	50
5.6	Analyse exhaustive des dangers pour la production du <i>tomato ketchup hot</i> et de la sauce <i>french dressing aux herbes</i> , selon la norme ISO 22000:2005 .....	51
5.6.1	Généralités .....	51
5.6.2	<i>Tomato ketchup hot</i> .....	51
5.6.3	<i>French dressing aux herbes</i> .....	54
6	Conclusion et Perspectives.....	56
7	Remerciements .....	58
8	Bibliographie .....	59
9	Annexes .....	69



## 1 LISTE DES ABRÉVIATIONS :

ATCC	: American Type Culture Collection
$a_w$	: Water activity
BPF	: Bonnes pratiques de fabrication
BPH	: Bonnes pratiques d'hygiène
BRC	: British Retail Consortium
CCP	: Critical Control Point
$\Delta \log$	: Différence de logarithmes
DSM	: Deutsche Sammlung Microorganismes
G	: Accélération de la gravité standard
GFSI	: Global Food Safety Initiative
HACCP	: Hazard Analysis and Critical Control Point
ICD	: Industry Council for Development
IFS	: International Food Safety
ISO	: International Standardisation Organisation
ISO 22000	: NF EN ISO 22000:2005 Système de management de la sécurité alimentaire - Exigences pour tout organisme appartenant à la chaîne alimentaire
MSDA	: Manuel suisse des denrées alimentaires
NEP	: Nettoyage en place
$N_F$	: Nombre final de germes
$N_o$	: Nombre initial de germes
NPP	: Nombre le plus probable
oPRP	: Operational Prerequisite Program
PEMBA	: Polymixin pyruvate Eggolk Mannitol Bromothymol blue Agar
PRP	: Prerequisite Program
pH	: Potentiel Hydrogène
rpm	: Round Per Minute
SMSA	: Système de Management de la Sécurité Alimentaire
UFC	: Unité Formant une Colonie
VL	: Verdünnungslösung

## 2 INTRODUCTION

### 2.1 PRÉSENTATION DE L'ENTREPRISE HUGO REITZEL <sup>[A]</sup>

La Société des Denrées Coloniales a bien évolué depuis 1909 ! Le site d'Aigle, certifié IFS et BRC, fabrique toute une gamme condimentaire comprenant les produits au vinaigre, les olives, les câpres, les moutardes, mayonnaises, sauces à salade et bien évidemment le ketchup. Les sauces représentent 53% du chiffre d'affaire de l'entreprise et, à terme, le site suisse du groupe produira essentiellement de la mayonnaise, des sauces dressings, du ketchup et d'autres accompagnements. L'importance relative de chaque produit est mise en évidence par la figure 1. Bien que la capacité annuelle de la conserverie soit de 3000 tonnes, l'avenir de l'entreprise, c'est les sauces, ceci est confirmé par leur production qui s'élève déjà à 1800 tonnes par an. Ce secteur ne cesse de se développer et Reitzel SA devient le plus grand producteur de ketchup de Suisse, avec une production d'environ 1000 tonnes par an.

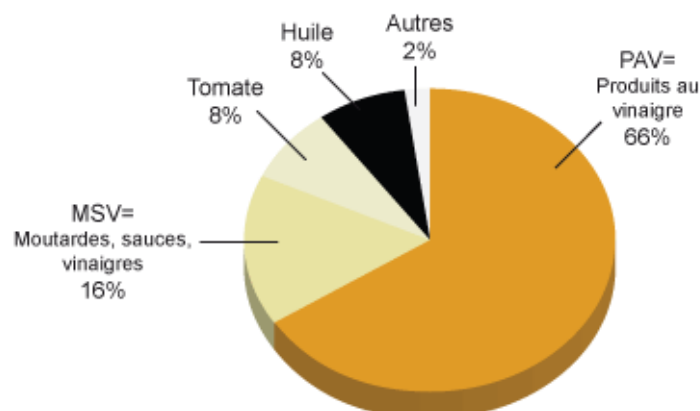


Figure 1 : Répartition par type de produit fabriqué par Hugo Reitzel suisse <sup>[B]</sup>

Cette année la marque Hugo Reitzel a su se démarquer en termes d'image. Récemment, l'entreprise a dévoilé sa toute nouvelle ligne graphique, habillant ses produits en noir et or. Ce changement de design met en évidence la qualité supérieure des produits proposés par la marque et leur confère un caractère innovant et contemporain.

## 2.2 LE KETCHUP

Plusieurs théories existent sur l'origine du mot ketchup, voici celle qui semble la plus probable.

L'origine du ketchup, qui régale les papilles des tout petits comme des grands depuis l'enfance, remonterait au 18<sup>ème</sup> siècle. A cette époque, les Chinois utilisaient depuis longtemps, de la sauce fermentée « Ké Tsiap » pour agrémenter leurs plats. Cette sauce était réalisée à partir du jus de poisson conservé. Elle est ensuite arrivée jusqu'en Malaisie où elle était appelée « Kecap » (prononcé « ketchap »), ce qui signifie bromure de poisson. Cette sauce relevée et épicée ne contenait aucune tomate, encore inconnue en Chine, à cette époque. Des anglais rapportèrent d'un voyage en Orient cette même sauce et y ajoutèrent de la tomate, des champignons et du sucre, afin d'adapter cette découverte à leur palais. Plus tard, les colons britanniques introduisirent la sauce en Amérique. C'est ainsi que naquit le ketchup que le monde actuel connaît. Ce n'est qu'à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, qu'un dénommé Henri John Heinz commença à produire le ketchup, en série.<sup>[C]</sup>

La fabrication du ketchup est un processus simple, qui consiste à mixer tous les ingrédients composant la recette puis à pasteuriser le mélange obtenu, avant de le conditionner. Une pasteurisation adéquate du produit est l'étape critique qui doit assurer l'absence de germes végétatifs pathogènes et réduire le nombre d'organismes capable d'altérer le produit. De ce fait, la température et le temps de pasteurisation sont les paramètres critiques à surveiller, afin d'assurer un traitement thermique efficace et garantir ainsi la sécurité du consommateur.

Peu de chiffre et d'informations sont communiqués a propos de ce produit. Aucune maladie infectieuse n'a pu être mise en relation avec la consommation de ketchup. Cette sauce est consommée par un large pourcentage de la population, bien que dans l'idéologie populaire, elle soit souvent associée à la restauration rapide.

## 2.3 LA SÉCURITÉ AU SEIN DE L'ENTREPRISE HUGO REITZEL

Reitzel possède une politique de suivi et de contrôle de ses matières premières, qui garantit leurs traçabilités ainsi que leurs qualités, car elle sait s'entourer, par exemple, de fournisseurs assurant des bonnes pratiques agricoles. Le système qualité, fiable et performant, de la maison Reitzel, repose sur une démarche HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point).

« L'analyse des dangers et points critiques pour leur maîtrise », qui est la traduction française de l'abréviation HACCP, est née aux Etats-Unis vers la fin des années soixante, pour assurer la sécurité alimentaire des astronautes. L'outil de travail que représente l'HACCP, permet aux entreprises agroalimentaires de définir des dangers spécifiques et indique les mesures à prendre en vue de les maîtriser et de garantir la salubrité de l'aliment.



C'est donc une méthode préventive et non curative, qui évolue en fonction des progrès, des méthodes et de l'innovation. Dans le domaine alimentaire, le/les danger(s) se trouvent principalement sous forme de dangers microbiologiques, chimiques ou physiques et consistent en substances ou organismes non désirés qui entrent en contact avec l'aliment et peuvent devenir nuisible pour la santé du consommateur.

La séquence logique d'application du système HACCP se base sur 12 étapes. Ces étapes peuvent être groupées en trois parties successives. Tout d'abord, la connaissance du produit et de sa fabrication (étapes 1 à 5). Puis, l'énumération des dangers, l'analyse des risques et la fixation de seuils critiques pour chaque CCP identifiés (étape 6 à 10). Enfin, l'application de procédures de surveillance et l'enregistrement des données (étapes 11 et 12). La validation d'un plan HACCP consiste à attester que les dangers énumérés sont évalués de manière raisonnable, que les mesures de maîtrise sont applicables et efficaces, que les limites critiques sont réellement atteintes et que les actions correctives permettent effectivement le rétablissement de la sécurité.<sup>[8]</sup>

## **2.4 LE CONCEPT DE LA NORME ISO 22000:2005**<sup>[5][8]</sup>

La naissance de l'ISO 22000 est due à un désir d'harmonisation et de simplification. Il faut rappeler que depuis 1997, une série de normes nationales et privées prolifèrent. Les plus connues sont évidemment le British Retail Consortium (BRC), qui est la première norme privée de Système de Management de la Sécurité Alimentaire (SMSA) édictée par des distributeurs anglais, et l'International Food Standard (IFS), référentiel créé par les allemands. En 2001, la Global Food Safety Initiative (GFSI) voit le jour et a pour objectif d'établir un seul référentiel reconnu par tous les distributeurs. Bien que l'idée soit bonne, chaque pays prône l'utilisation de son propre référentiel et l'exercice de la GFSI se résume à établir les éléments clés des normes, sur la sécurité alimentaire. Bien vite, BRC et IFS accèdent à la reconnaissance, de la part de la GFSI, ce qui a pour conséquence la perte de l'objectif premier, qui est d'établir un référentiel unique.

C'est en ce sens que ISO 22000 est créée, elle se veut une norme internationale de sécurité alimentaire. L'harmonisation, qu'elle apporte, passe par le regroupement des normes internationales ou privées, proliférant depuis 1997. Elle concilie le niveau d'exigences entre ces normes et simplifie la tâche des entreprises ainsi que l'accréditation des certificateurs. Elle évite également le protectionnisme des détenteurs de normes privées, citées plus haut.

La norme ISO 22000 s'appuie sur la méthode HACCP et les bonnes pratiques d'hygiène, tout en y apportant des compléments nécessaires à sa bonne utilisation. La figure 2 illustre bien cet état de fait.

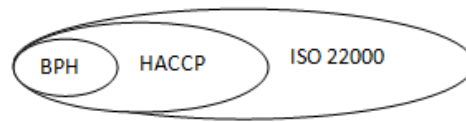


Figure 2 : les outils de la norme ISO 22000

La grande différence apportée par cette norme, réside dans le fait qu'elle est conçue pour s'appliquer à toute la chaîne alimentaire, du secteur primaire à la distribution, et non pas à quelques maillons de la chaîne seulement.

Afin de mieux comprendre les termes utilisés dans les analyses des dangers réalisées, dans le cadre de ce travail, il faut connaître les définitions des trois piliers de l'ISO 22000.

Les programmes prérequis (PRP) constituent les conditions et activités initiales nécessaires pour maintenir, tout au long de la chaîne alimentaire, un environnement salubre et adapté à la fabrication, la manutention et à la distribution de produits alimentaires sûres pour la santé du consommateur. Les PRP ne sont pas sélectionnés pour maîtriser un danger spécifique.

Les programmes prérequis opérationnels (oPRP) sont des PRP identifiés par l'analyse des dangers, comme essentiels pour contrôler la probabilité d'introduction d'un danger, d'une contamination ou d'une prolifération des dangers dans les produits ou dans l'environnement de fabrication. Les oPRP maîtrisent les dangers qui ne sont pas gérés par le plan HACCP.

Les points critique pour la maîtrise (CCP), sont des étapes du processus de fabrication auxquelles un danger lié à la sécurité alimentaire, pourra être prévenu, éliminé ou ramené à un stade acceptable.

## 2.5 LES SOUCHES CHOISIES POUR LA DÉTERMINATION DE LA TEMPÉRATURE CRITIQUE DE PASTEURISATION

Le ketchup n'est pas un milieu idéal pour la croissance de microorganismes, du fait de sa teneur en acide acétique et de son faible pH. Pour représenter les germes pathogènes, *Salmonella typhimurium* a été choisie car sa présence dans les épices a été démontrée<sup>[19]</sup>. Les germes d'altération du ketchup sont essentiellement des levures et des *Lactobacillus spp.* ayant une bonne résistance à l'acide acétique<sup>[18]</sup>. De ce fait, il a été décidé de travailler avec *Zygosaccharomyces baillii* et *Lactobacillus plantarum*. Etant donné la présence d'épices dans le produit, des spores de souches sauvages de *Bacillus cereus* ont été préférées à ceux de *Clostridium perfringens*, pour l'observation de l'influence du ketchup sur leur évolution, en raison de leur plus grande résistance, en général. En effet, la gamme de pH de *C.perfringens* est, par exemple, moins grande que celle de *B.cereus*<sup>[7]</sup>.

### 2.5.1 *LACTOBACILLUS PLANTARUM* <sup>[12]</sup>

*L. plantarum* est du genre *Lactobacillus*, c'est une bactérie lactique mésophile montrant une forte tolérance à l'acidité. Elle est homofermentaire car elle fermente les sucres en produisant de l'acide lactique uniquement. Cette espèce peut se développer en présence d'oxygène, elle est dite aérotolérante. Cette bactérie a beaucoup d'importance en microbiologie alimentaire, mais dans le cas du ketchup, elle participe à l'altération du produit. Cette altération se traduit à la surface du produit par la présence d'une matière visqueuse et un verdissement général.

### 2.5.2 *SALMONELLA SPP.* <sup>[15]</sup>

Les salmonelles sont largement répandues dans la nature. Elles sont présentes dans le tube digestif de l'homme et des animaux, ces derniers contaminent ainsi le milieu environnant par leurs excréments. Cette bactérie pathogène entérique est à l'origine de maladies déclenchées par l'absorption d'eau ou d'aliments contaminés. Les salmonelloses sont les toxi-infections alimentaires<sup>1</sup> les plus fréquentes dans les pays industrialisés. Si elles sont sans grande gravité pour la plupart des malades, il faut rappeler que les plus vulnérables peuvent mourir de la salmonellose.

### 2.5.3 *BACILLUS CEREUS* <sup>[7] [14]</sup>

*Bacillus cereus* est un bacille sporulé, qui est grandement répandu dans la nature. Indigène du sol, la bactérie est véhiculée par la poussière et l'eau, touchant ainsi un grand nombre de produits alimentaires comme les herbes et les épices. Il supporte un pH entre 4.4 et 9.3. Ses spores sont thermorésistantes, la pasteurisation n'a donc aucun effet sur elles. Cette bactérie est rarement associée à une intoxication alimentaire chez l'homme, car il faut ingérer une prolifération de germes importante, de l'ordre de  $10^7$ - $10^9$  ufc/g, pour provoquer la maladie. Les conditions d'une intoxication sont les aliments contaminés, faiblement chauffés, ce qui permet d'inactiver la flore cohabitante et d'activer les spores. *B. cereus* produit deux exotoxines, qui sont la toxine diarrhéique, sécrétée durant la phase exponentielle et stationnaire, et la toxine émétique, formée pendant la sporulation.

### 2.5.4 *ZYGOSACHAROMYCES BAILII* <sup>[17]</sup>

Cette levure fermentaire anaérobie facultative, affectionne les faibles pH et les concentrations élevées en sucre. Cette levure est osmophile et supporte bien l'acidité. De ce fait, elle altère fréquemment les aliments comme la mayonnaise et les sauces à salade, en formant du gaz.

---

<sup>1</sup> Les toxi-infections alimentaires (TIA) sont des « foyers épidémiques d'au moins deux personnes affectées par la même maladie d'origine alimentaire »

## 2.6 LES OBJECTIFS

Les objectifs de ce travail de diplôme, sont axés sur la sécurité alimentaire et correspondent à la deuxième partie des douze étapes de l'HACCP décrit sous 2.2.

Dans un premier temps, il s'agit de valider le procédé de pasteurisation du *Tomato ketchup* de Reitzel SA, à une température de 85°C durant trois minutes respectivement 6 minutes et 40 secondes. La diminution progressive de la température de pasteurisation doit ensuite permettre de déterminer la température critique de pasteurisation du ketchup. Cette limite critique est à trouver en gardant fixe, la durée du traitement thermique.

Une fois la détermination des seuils critiques du couple temps/température identifiés, il est possible de valider le barème de pasteurisation en fonction des différentes analyses empiriques effectuées au laboratoire de microbiologie de la HES-SO Valais.

La partie pratique comprend également l'étude du suivi des spores bactériennes dans le ketchup. Le but de cette analyse est d'observer, le comportement et l'évolution éventuelle des spores dans le milieu, en fonction du temps. Les résultats obtenus permettront d'analyser, de manière raisonnable, les dangers liés aux spores bactériennes dans le ketchup.

Dans un deuxième temps, une analyse exhaustive des dangers, selon la norme ISO 22000:2005, est à réaliser pour la production de *Tomato ketchup* et de sauce *french dressing aux herbes*, produits par la maison Hugo Reitzel.

### 3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 3.1 MATÉRIELS

##### 3.1.1 SOUCHES

- *Salmonella typhimurium* ATCC 13 311
- *Lactobacillus plantarum* DSM 20174
- *Zygosaccharomyces baillii*, HES-SO Valais
- Spores de souches sauvages isolées du poivre de Cayenne et du poivre blanc moulu, utilisés et fournis, par l'entreprise Hugo Reiztel
- Spores de souche sauvage de *Bacillus cereus*, reconnus par l'Union Européenne, inoculées le 20.10.2008 par le laboratoire de microbiologie de la HES-SO Valais et conservés sur une plaque PEMBA

##### 3.1.2 MILIEUX ET PRODUITS

Les différents milieux et produits utilisés lors du travail de diplôme sont présentés dans le tableau 1. Ils ont été préparés conformément aux indications des fournisseurs et stockés selon les bonnes pratiques de laboratoire de la HES-SO Valais.

**Tableau 1** : Milieux et produits utilisés pour le travail de diplôme

Milieux - Produits	Code	Fournisseurs
- AK (Sporulation-Agar)	402 070	Biolife (Italy)
- MRS-agar (with tween 80)	401 7282	Biolife (Italy)
- PCA (Plate Count Agar)	402 1454	Biolife (Italy)
- XLD (Xylose Lysine Deoxycholate Agar)	CM 0469	OXOID LTD (England)
- YGC (Yeast extract glucose chloramphenicol agar)	1.16000.0500	Merck (Germany)
- BPW (Peptone Water Buffered acc. to ISO 6579)	1.07228.0500	Merck (Germany)

Milieux - Produits	Code	Fournisseurs
- MRS-broth (with tween 80)	401 7292	Biolife (Italy)
- NB (Nutrient Broth)	401 815	Biolife (Italy)
- SDB2% (Sabouraud Broth)	402 000	Biolife (Italy)
- TSB (Tryptic Soy Broth)	402 1552	Biolife (Italy)
- NaCl (chlorure de sodium en poudre)	7647-14-5	Carlo Erba RPH (Italy)
- Peptone (Tryptic digest of casein)	412 3402	Biolife (Italy)
- Lysozyme Molecular Biology grade	9001-63-2	AppliChem Biochemica (Germany)
- Ethanol absolu (qualité analytique)	-	HES-SO (Switzerland)
- <i>TOMATO KETCHUP</i> , en bouteilles squeezes de 340 g	-	Hugo Reitzel (Switzerland)



### 3.1.3 EQUIPEMENTS ET APPAREILLAGE

Afin de pouvoir mener à bien les divers essais décrits sous 3.2 Méthodes, différents appareils et équipements ont été nécessaires, ils sont répertoriés dans le tableau 2.

**Tableau 2** : Appareils et équipements utilisés pour le travail de diplôme

Descriptif	Fournisseurs	Type	Lieu
- Etuves (ventilée / 30°C et 37°C)	Memmert GmbH & Co. KG	BE 600	Berlin (Germany)
- Etuve (ventilée / thermostat réglable)	Memmert GmbH & Co. KG	ULE 500	Berlin (Germany)
- Incubateur agité	Sheldon Manufacturing Inc.	SI6R-2	Cornelius (USA)
- Centrifugeuse (rotor type 1617)	Hettich GmbH & Co. KG	Universal 32R	Tuttlingen (Germany)
- Centrifugeuse (rotor HFA 12.500)	Herolab GmbH & Co. KG	HiCen XL	Wiesloch (Germany)
- Tubes en polypropylène (adaptés au rotor HFA 12.500)	HES-SO	-	Valais (Switzerland)
- Appareil (ensemencement en spiral)	Instrumenten Gesellschaft AG	Eddy Jet	Zürich (Switzerland)
- Flux laminaire	ADS Laminaire	Optimal 12	Le Pré-Saint- Gervais (France)
- Microscope	Olympus Optical Co. LTD	BX 41	Europe
- Balance (précision $\pm 0.01g$ )	Mettler Toledo AG	Delta Range/PM 4800	Nänikon (Switzerland)
- Balance (précision $\pm 0.001g$ )	Huber & Co. AG	Sartorius/BL 3100	Reinach (Switzerland)
- Thermomètre de contact	IKA® GmbH & Co. KG	ETS-D4 fuzz	Staufen (Germany)
- Plaque magnétique (agitation et chauffage)	IKA® GmbH & Co. KG	RCT basic	Staufen (Germany)
- Bain de paraffine	HES-SO	-	Valais (Switzerland)
- Autoclave	HMC	HICLAVE™ HV 85	Europe
- Four micro-onde	Franke AG	FM 1300	Aarburg (Switzerland)
- Bain-marie avec agitation	Müller & Krempel SA	Salvis	Bülach (Switzerland)
- Agitateur	Milian SA	Yelloline 0510	Genève (Switzerland)
- pH-mètre (précision $\pm 0.01$ )	Metrohm AG	691	Zofingen (Switzerland)
- Stresstech Rheometer	Rheologica Instruments AB	Peltier Couette Power Box	Lund (Sweden)
- Matériel standard de laboratoire	HES-SO	-	Valais (Switzerland)

## 3.2 MÉTHODES

### 3.2.1 ISOLATION, DE SPORES DE SOUCHES SAUVAGES, À PARTIR DU POIVRE BLANC ET DU POIVRE DE CAYENNE

Des spores de souches sauvages ont été isolées des deux principales épices présentes dans le ketchup, à savoir le poivre blanc moulu et le poivre de Cayenne. Ces spores indigènes du produit sont susceptibles de posséder une résistance à la chaleur plus importante qu'une espèce provenant d'une collection. L'isolation des spores a été réalisée comme expliqué ci-dessous :

Environ 5 g de poivre blanc moulu, respectivement de poivre de Cayenne, sont suspendus dans 20 ml de VL. Le mélange est vortexé afin d'homogénéiser au mieux la suspension. Trois plaques AK, qui est un milieu favorisant la sporulation, sont ensuiteensemencées en surface avec 0.3 ml de chaque suspension, et les six plaques sont incubées, 24 heures à 30°C. Un repiquage<sup>2</sup>, de quatre colonies au maximum, parmi les trois plaques incubées est réalisé pour chaque sorte de poivre, sur une nouvelle plaque du même milieu. Le repiquage sur plaque AK est effectué à double et les plaques sont incubées (entre sept et quinze jours) jusqu'à l'obtention d'une sporulation supérieure à 90%. Afin de s'assurer de l'étendue de la sporulation, une analyse microscopique des différentes plaques, est nécessaire.

### 3.2.2 PRÉPARATION DE LA SUSPENSION DE SPORES

Afin d'obtenir une suspension de spores pouvant être utilisée et conservée pendant la durée du travail de diplôme, le protocole interne de la HES-SO Valais<sup>[23]</sup> a été suivi avec les modifications suivantes :

- La suspension n'est pas soumise à un traitement thermique.
- La vitesse de centrifugation utilisée est de 3910 G
- La suspension est conservée dans de l'eau déminéralisée stérile

Une fois la suspension obtenue, une analyse microscopique est effectuée avec une chambre de comptage<sup>[6]</sup> afin d'estimer le nombre initial de spores dans la suspension. Il est alors possible de la diluer tout en sachant que pour les essais de pasteurisation à venir, elle doit contenir environ  $10^9$  ufc/ml. Le dénombrement exact de  $N_0$  est réalisé par ensemencement dans la masse sur un milieu PCA. Une dilution est choisie et celle-ci estensemencée à double, avant d'incuber les plaques en atmosphère aérobie, 24 heures à 30°C, selon le MSDA<sup>3</sup>. Les dilutionsensemencées sont consultables aux sommets des annexes [IV], [V] et [VI].

---

<sup>2</sup> Prélever des colonies de la plaque d'origine à l'aide d'une anse stérile et les déposer en striant la surface de l'agar, de la nouvelle plaque

<sup>3</sup> Le MSDA indique un temps d'incubation allant de 18 à 48 heures, mais ces spores ont un développement rapide et une incubation de deux jours est trop longue pour pouvoir effectuer un dénombrement correct.

Cette méthode de préparation a été utilisée pour obtenir une suspension de spores de souches sauvages provenant du poivre de Cayenne, une suspension de spores de souches sauvages provenant du poivre blanc et deux suspensions de spores de souche sauvage de *Bacillus cereus*, provenant de deux plaques PEMBA appartenant à la HES-SO Valais.

Les suspensions de spores provenant des deux différents poivres ont été mélangées afin d'obtenir une suspension de spores de souches sauvages représentant les épices. Cette suspension a été utilisée lors des essais de pasteurisation ainsi que lors du suivi de l'évolution des spores, provenant des épices, dans le ketchup. Les suspensions de spores de souches sauvages de *Bacillus cereus*, quant à elles, ont été utilisées uniquement pour le suivi de l'évolution de ses spores dans le ketchup.

### 3.2.3 PRÉPARATION DES SOUCHES

Les tableaux suivants présentent les milieux et les bouillons de cultures utilisés, ainsi que les conditions d'incubation en fonction des différentes souches choisies.

**Tableau 3 :** Milieux de cultures et conditions d'incubation pour les souches utilisées

Souches	Milieux	Incubation
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS-agar	37°C / 3 jours / en surface
<i>Salmonella typhimurium</i>	XLD	37°C / 18 à 24 heures / en surface
<i>Zygosaccharomyces baillii</i>	YGC	30°C / 4 jours / en surface
Spores de <i>Bacillus cereus</i> et spores de souches sauvages isolées des épices	PCA	30°C / 24 heures / en masse

**Tableau 4 :** Bouillons de culture et conditions d'incubation pour les souches utilisées

Souches	Bouillons	Incubation
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS-broth	37°C / 3 jours / agitation de 150 rpm
<i>Salmonella typhimurium</i>	TSB	37°C / 18 à 24 heures / agitation de 150 rpm
<i>Zygosaccharomyces baillii</i>	SDB	30°C / 4 jours

Les souches de références *Lactobacillus plantarum* et *Zygosaccharomyces baillii* ont été repiquées sur leurs milieux respectifs, alors que *Salmonella typhimurium* a été repiquée sur un milieu PCA afin de travailler avec des souches fraîches et s'assurer de leurs vitalités. Les nouvelles plaques ont ensuite été incubées selon le tableau 3, en accord avec le MSDA<sup>[22]</sup>.<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Il est à noter que *Zygosaccharomyces baillii* est incubé à 30°C et non à 25°C comme mentionné dans le MSDA, car le dénombrement de la levure était plus aisé après 4 jours à 30 °C.

### Culture des souches

Trois tubes contenant 5 ml de bouillon de culture sont stérilisés pour chacune des trois souches définies. Chaque tube est ensuiteensemencé avec sa souche respective et mis à incuber selon le tableau 4. Après incubation, 1 ml de chaque tube est transféré dans un erlenmeyers contenant 300 ml de même bouillon, stérilisé au préalable. Les erlenmeyers sont ensuite incubés selon les indications du tableau 4. Il faut préciser que toutes les incubations se font en atmosphère aérobie.

Il est à noter que lors de la préparation de la souche *Salmonella typhimurium*, un seul erlenmeyer suffit pour obtenir le nombre initial de germes désiré, alors que pour *Lactobacillus plantarum* et *Zygosaccharomyces baillii*, ce sont deux erlenmeyers, respectivement quatre erlenmeyers qui doivent être préparés, en parallèle, pour obtenir un  $N_0$  satisfaisant.

### Concentration des souches

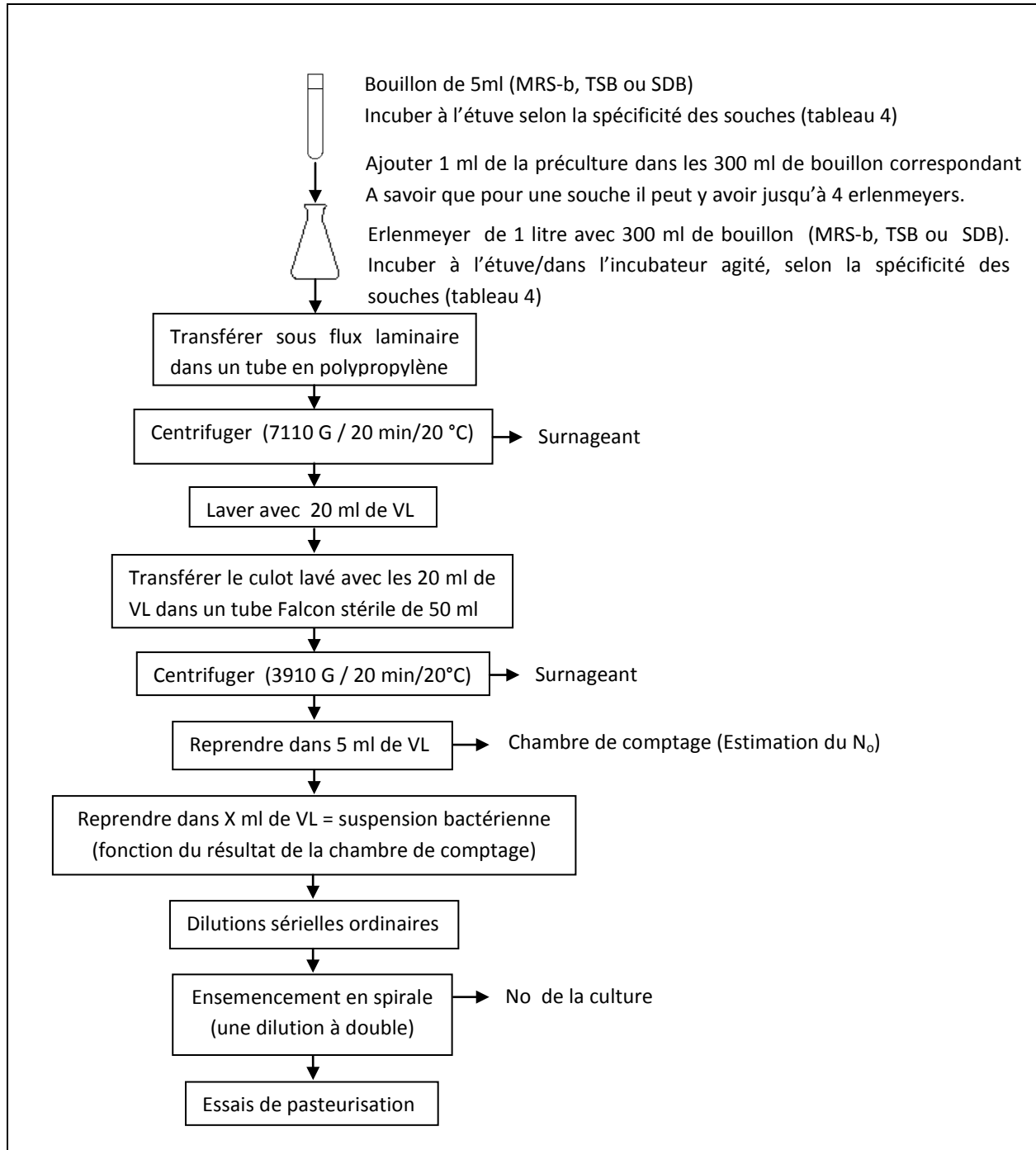
Une fois l'incubation terminée, le contenu de l'erlenmeyer est transféré, sous flux laminaire, dans un tube en polypropylène stérile, puis il est centrifugé à une vitesse de 7110 G pendant 25 minutes à 20°C. Toujours sous flux laminaire, le surnageant est éliminé, le pellet est lavé, avec environ 20 ml d'eau physiologique stérile, puis la suspension est amenée dans un tube Falcon stérile de 50 ml. Le tube Falcon est centrifugé à une vitesse de 3910 G pendant 25 minutes à 20 °C. Il est alors possible d'éliminer le surnageant et de le reprendre dans 5 ml d'eau physiologique stérile. Afin que la suspension soit bien homogène, il faut vortexer environ 1 minute le mélange.

### Dénombrement de la culture concentrée

Une analyse microscopique est effectuée avec une chambre de comptage afin d'estimer le nombre initial de germes dans la suspension. Il est alors possible de la diluer tout en sachant que pour les essais de pasteurisation à venir, elle doit présenter un  $N_0$  supérieur à  $10^9$  ufc/ml.

Le dénombrement exact de  $N_0$  est réalisé par ensemencement en spirale sur les milieux correspondant à chaque souche. Une seule dilution est choisie, les détails se trouvent aux annexes [VII], [VIII] et [IX]. Cette dilution est ensemencée à double avant d'incuber les plaques selon les indications du tableau 3. La suspension bactérienne est donc conservée au maximum une semaine au réfrigérateur (Température < 5°C) dans le tube Falcon.

La figure 3 illustre le mode opératoire suivi pour la préparation de chaque souche.



**Figure 3 :** Schématisation de la procédure de préparation des souches

### 3.2.4 INFLUENCE DU KETCHUP SUR LA VITALITÉ DES SOUCHES

Afin de se rendre compte de l'influence de la teneur en acide acétique et du faible pH du ketchup, sur les différentes souches, divers tests ont été effectués.

Une fois que la suspension bactérienne ( $N_0$ ) est obtenue selon la méthode décrite sous 3.2.3, un volume de 1 ml<sup>5</sup>, de cette même suspension, est inoculé dans environ 15 ml de ketchup, ce qui correspond à une masse d'environ 17.3 grammes<sup>6</sup>. Le mélange est bien homogénéisé et un échantillon ( $N_{F1}$ ) est prélevé pour être dénombré par ensemencement en spirales sur les milieux correspondant à chaque souche. Il faut noter que cet échantillon est prélevé environ 20 minutes après l'inoculation. Une seule dilution est choisie, et cette dilution est ensemencée à double avant d'incuber les plaques selon les indications du tableau 3. Les détails des dilutions choisies se trouvent à l'annexe [III]. Le mélange est gardé à température ambiante, dans un tube Falcon stérile. Après 24 heures, un nouveau prélèvement ( $N_{F2}$ ) est effectué et dénombré de la même manière que cité ci-dessus.

Considérant *Salmonella typhimurium* comme plus sensible à l'acidité que les deux autres souches, il a été décidé de prélever un échantillon supplémentaire ( $N_{F1'}$ ) environ cinq heures après avoir inoculé le ketchup. La méthode de dénombrement est identique à celle des autres prélèvements.

### 3.2.5 SUIVI DE L'ÉVOLUTION DES SPORES ET DES GERMES VÉGÉTATIFS DANS LE KETCHUP

La pasteurisation n'ayant aucun effet sur la survie des spores, il est nécessaire de se rendre compte de leur comportement dans la matrice qu'est le ketchup.

Pour ce faire, les suspensions de spores préparées sous 3.2.2 ont été utilisées, les  $N_0$  des suspensions sont donc connus. Les évolutions, des spores isolées des épices ainsi que des spores de *Bacillus cereus*, sont suivies. Une quantité de ketchup de  $300 \text{ g} \pm 6 \text{ g}$  a été pesée dans une bouteille stérile de 500 ml avant qu'un certain volume de spores y soit inoculé afin d'obtenir un  $N_0$  d'environ  $10^4$  ufc/g. Les quantités inoculées figurent aux annexes [IV], [V] et [VI]. La bouteille fermée est ensuite laissée à température ambiante ( $T^{\circ}\text{C}_{\text{moyenne}} = 22.4^{\circ}\text{C}$ ) et des échantillons sont prélevés régulièrement comme décrit ci-dessous.

Une fois le ketchup inoculé et bien homogénéisé<sup>7</sup>, un premier échantillon de 1.15 g, qui correspond au jour 0, est prélevé dans un tube de 9 ml d'eau physiologique stérile. Après une série de dilutions décimales, une seule dilution, comme indiqué au tableau 5, est ensemencée dans la masse à double, et incubée selon les indications du tableau 3.

<sup>5</sup> Pour le test avec *Zygosaccharomyces baillii* ce sont 2 ml de la suspension bactérienne qui ont été mélangés à 9.2 g de ketchup

<sup>6</sup> La densité du *Tomato ketchup* est de 1.15

<sup>7</sup> La bouteille est agitée manuellement et énergiquement pendant cinq minutes.



Il faut préciser qu'au jour 0, seul le suivi des spores est réalisé car le développement éventuel des germes végétatifs n'est pas possible au vu du court laps de temps séparant la manipulation de l'ensemencement.

Les jours suivants, les prélèvements se sont déroulés de la même manière. A partir de la suspension obtenue, les dilutions décimales nécessaires, indiquées par le tableau 5, sont effectuées, pour le suivi des germes végétatifs. Pour le suivi des spores, en revanche, un traitement à l'éthanol est nécessaire afin d'éliminer les germes végétatifs et ne dénombrer que les spores présentes dans l'échantillon. Le traitement à l'éthanol est réalisé selon la méthode indiquée par le MSDA,<sup>[21]</sup> avec la précision que le mélange éthanolique est constitué de 5 ml de la dilution  $10^{-1}$  et 5 ml d'éthanol absolu. Une fois le traitement terminé, les dilutions décimales ordinaires sont mises en œuvre et seules celles qui figurent au tableau 5, sont ensemencées. Les conditions et milieu d'incubation se trouvent au tableau 3.

**Tableau 5** : Résumé des dilutions ensemencées en fonction des différents stades des suivis de chaque suspension de spores

Suspensions de spores	Jour (s) de prélèvement	Dilutions pour le suivi des germes végétatifs	Dilutions pour le suivi des spores
<i>B. cereus</i> (14.05.09)	0	-	-3
<i>B. cereus</i> (14.05.09)	1 et suivant	-3	-2
Epices (09.06.09)	0	-	-3
Epices (09.06.09)	1 et suivant	-2	-2
<i>B. cereus</i> (09.06.09)	0	-	-3
<i>B. cereus</i> (09.06.09)	1 et suivant	-3	-3

### 3.2.6 DÉROULEMENT DES ESSAIS DE PASTEURISATION DU KETCHUP

Les conditions de pasteurisation appliquées par l'entreprise, présentent une température de 85°C pour une durée totale de 400 secondes. Les essais de pasteurisation effectués consistent à déterminer la température critique assurant la salubrité de l'aliment, sachant que la durée de pasteurisation est fixe.

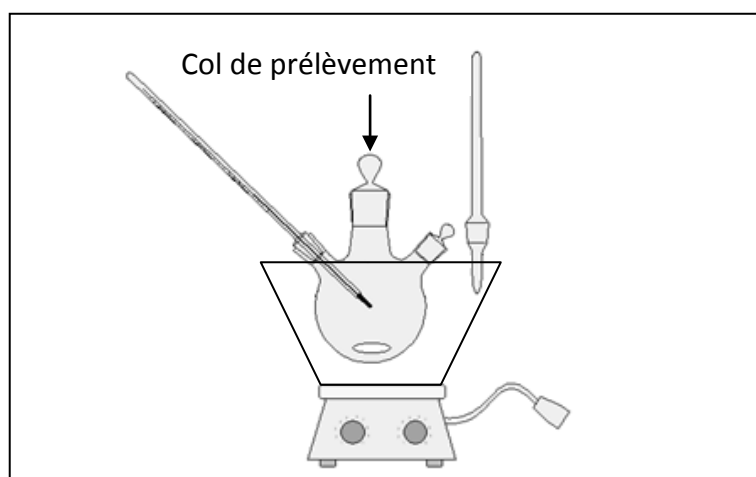
Un grand nombre d'essais préliminaires ont permis de déterminer que la température critique de pasteurisation devait probablement se situer autour de 60°C. Une fois le mode opératoire et la méthode de dénombrement testés et confirmés, il a été décidé de se concentrer sur quatre températures, soit 50°C, 55°C, 60°C et 85°C. Les différentes analyses se sont déroulées comme suit :

## Montage

Les différents essais de pasteurisation se sont évidemment tous déroulés dans les mêmes conditions.

Afin de pouvoir constater l'effet propre de chaque température malgré un faible écart les séparant, il était indispensable de trouver un système garantissant une stabilité du bain à  $\pm 1$  °C. C'est pourquoi un bain de paraffine a été sélectionné, évitant ainsi le phénomène d'évaporation d'eau, propre à un bain-marie.

La régulation du bain est assurée par un thermomètre de contact alors que la lecture de la température du produit, se fait grâce à un thermomètre à mercure, en contact direct avec le ketchup. L'agitation de celui-ci est rendue possible grâce à un agitateur magnétique « obus » dont la grande taille permet une répartition homogène de la chaleur dans le produit. Il faut ajouter que le caractère homogène de la répartition de la chaleur relève également du fait, que l'épaisseur de ketchup, dans le ballon à trois cols, est raisonnable étant donné qu'une quantité de  $120 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$  est utilisée par ballons de 500 ml. La figure 4 illustre le montage effectué pour les essais de pasteurisation.



**Figure 4 :** Schéma du montage utilisé pour les essais de pasteurisation

## Mode opératoire

**Tableau 6** : Réglage du thermomètre de contact en fonction de la température désirée

Consigne à régler	Température du produit
55°C	50°C
60°C	55°C
66°C	60°C
95°C	85°C

Une fois le montage réalisé, deux ballons à trois cols, contenant  $120 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$  de ketchup ainsi que l'agitateur préalablement désinfecté et flambé<sup>8</sup> à l'éthanol, sont préchauffés dans l'étuve selon la température à tester (50°C, 55°C, 60°C et 85°C).

Puis, le thermomètre de contact est réglé comme indiqué par le tableau 6 et un ballon est fixé dans le bain de paraffine. Il est important de disposer des sécurités sur les bouchons afin d'éviter qu'ils ne sautent et perturbent l'essai. Une fois la température du ketchup stabilisée à la température souhaitée, le col principal du ballon est flambé et 1 ml de la suspension bactérienne, préparée selon 3.2.3, ou 1 ml de la suspension de spores provenant des épices préparée selon 3.2.2, est ajouté à l'aide d'une micropipette.

Il a été décidé que le  $N_0$  dans le ketchup serait d'environ  $10^7$  ufc/g afin de pouvoir constater d'importantes réductions. Comme expliqué précédemment, cette décision implique que la suspension bactérienne possède un  $N_0$  supérieur à  $10^9$  ufc/ml. Lorsque le chronomètre affiche 3 minutes, le col principal doit déjà être flambé et un échantillon est prélevé, à l'aide d'une pipette stérile de 10 ml, dans un tube Falcon stérile, préalablement refroidi sur glace. La quantité d'échantillon à prélever ne demande pas d'être précise, il s'agit d'avoir assez de produit pour la suite, soit au minimum 4.6 grammes.

Les tubes Falcon sont alors replacés sur glace afin de stopper le procédé de pasteurisation et donc l'inactivation thermique des germes. La pasteurisation est poursuivie jusqu'à 6 minutes et 40 secondes puis, de la même manière, un deuxième échantillon est prélevé. Il y a donc deux ballons pasteurisés et quatre échantillons prélevés pour chaque température testée. Un schéma du mode opératoire se trouve à l'annexe [I].

### Dénombrement du $N_F$ selon la méthode du nombre de germes le plus probable (NPP)

D'importantes réductions du nombre de germes sont attendues avec la pasteurisation, c'est pour cela que la méthode du NPP a été choisie en raison de sa faible limite de détection.

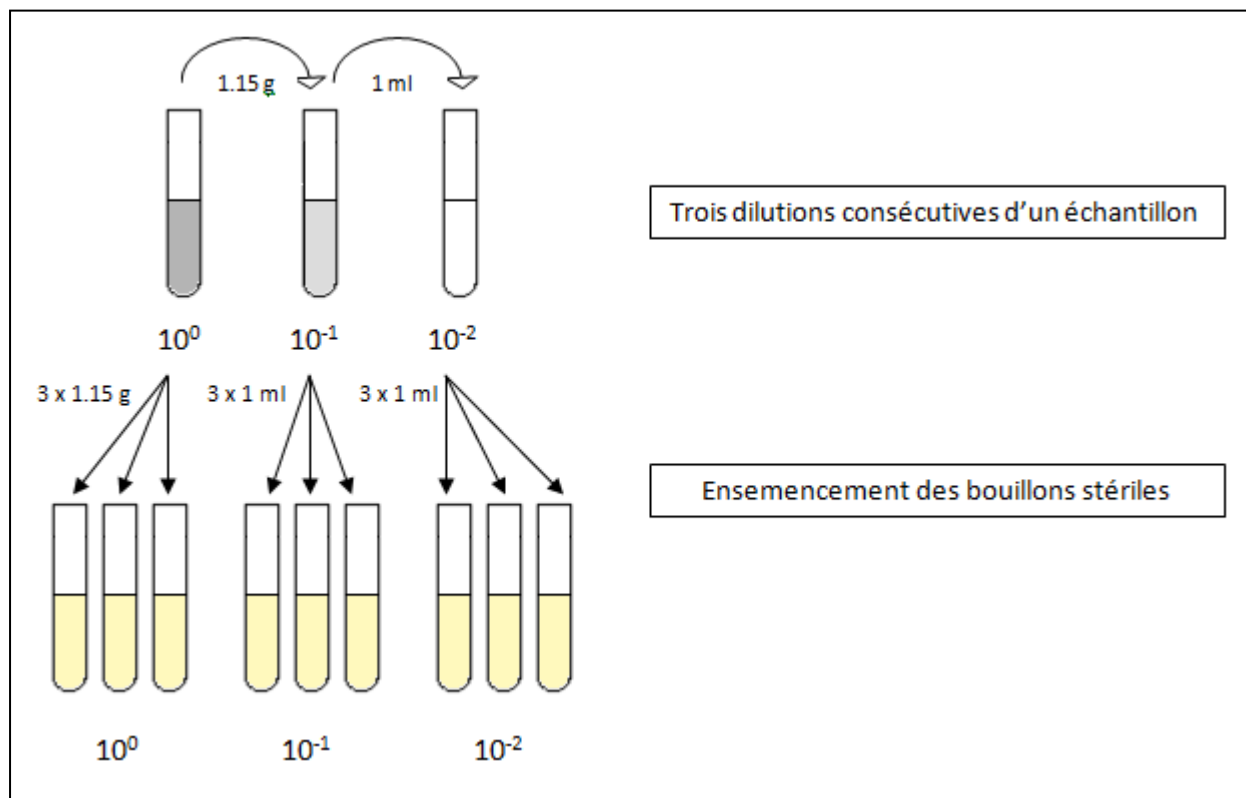
<sup>8</sup> L'agitateur est arrosé d'éthanol puis allumé avec un briquet

En effet, cette méthode permet, grâce aux trois dilutions sélectionnées de la figure 5, de détecter précisément, un nombre de germes le plus probable compris entre  $<0.3$  NPP/g et  $>110$  NPP/g. Il est alors possible de calculer, de manière exacte, d'importantes réductions.

Trois dilutions décimales consécutives sont chacune ensemencées dans trois tubes de bouillon stériles comme indiqué par le MSDA<sup>[20]</sup>. Au total, neuf tubes identiques de bouillon stérile sont nécessaires pour effectuer le dénombrement d'un échantillon, ceci est illustré par la figure 5.

Le pipetage du ketchup n'étant pas possible, au vu des grandes variations obtenues lors de pipetage répétés, il est donc nécessaire, d'après ces résultats d'ordre qualitatif, de peser le produit pour obtenir les dilutions  $10^0$ , soit trois tubes de bouillon et un tube d'eau physiologique.

Ainsi les dilutions  $10^0$  sont obtenues en ajoutant 1.15g de ketchup pasteurisé, dans chacun des tubes contenant 9 ml de bouillon stérile. Les dilutions  $10^{-1}$  correspondent à l'ajout de 1.15g de ketchup dans 9 ml d'eau physiologique stérile, puis 1 ml de cette suspension est ajouté dans trois tubes contenant 9 ml de bouillon stérile. Enfin, 1 ml de la dilution  $10^{-1}$  est ajouté dans 9 ml d'eau physiologique stérile, ensuite 1 ml de cette suspension est ajouté dans chacun des tubes contenant 9 ml de bouillon stérile, pour obtenir les dilutions  $10^{-2}$ .



**Figure 5 :** Schéma de la méthode

Une fois l'ensemencement terminé, les tubes de bouillons stériles sont mis à incubier.

Il faut préciser que les bouillons utilisés ainsi que les conditions d'incubation de *Lactobacillus plantarum* et *Zygosaccharomyces baillii*, pour la méthode du NPP, sont identiques aux bouillons et conditions de culture présentés au tableau 4.

En revanche, les échantillons provenant des essais réalisés avec *Salmonella typhimurium* ont été ensemencés dans des tubes de BPW et incubés 2 jours à 37°C, en atmosphère aérobie. Il a été décidé de faire ainsi car les éventuelles bactéries, survivantes à la pasteurisation ont subi un stress important, dès lors une incubation plus longue leur donne toutes les chances de se développer.

La méthode prévoit de tirer un résultat préliminaire de type, plus ou moins, selon que les tubes incubés présentent un trouble (+) ou non (-). Cela convient aux dilutions  $10^{-2}$  car après ensemencement, la suspension est limpide. Par contre, les tubes correspondant aux dilutions  $10^0$  et  $10^{-1}$  montrent un trouble important avant même l'incubation. De ce fait, les tubes sont mis à incubés puis un repiquage est effectué à l'aide de anses stériles sur les géloses respectives de chaque souche. Les différentes plaques sont ensuite mises à l'étuve. Les précisions quant aux milieux à utiliser et aux diverses conditions d'incubation se trouvent au tableau 3. S'il y a présence de germes sur le milieu, la dilution initiale donne un résultat positif sinon le résultat préliminaire donne un résultat négatif. Une estimation de la concentration microbienne de l'échantillon est ensuite obtenue par comparaison des codes avec une table statistique, celle-ci se trouve à l'annexe [II].

### Dénombrement du $N_F$ par dénombrement sur gélose après dilutions décimales

**Tableau 7 :** Dilutions à ensemercer pour le dénombrement de  $N_F$  en fonction de la température de l'essai

Température de la pasteurisation	Dilutions décimales pour le dénombrement de $N_F$
50°C	-1 / -2 / -3 / -4
55°C	-1 / -2 / -3
60°C	-1 / -2 / -3
85°C	-1

Etant donné que la méthode du nombre de germes le plus probable, peut donner un résultat indicatif, comme par exemple supérieur à 110 NPP/g, il est nécessaire de décompter parallèlement sur gélose afin d'obtenir un résultat chiffré. Il est ainsi possible de calculer des réductions exactes du nombre de germes. Pour ce faire, plusieurs dilutions décimales de l'échantillon sont réalisées comme indiqué au tableau 7, avant d'être ensemencées, à double, en surface sur les différentes géloses qui sont incubées selon les indications du tableau 3.

### 3.2.7 INFLUENCE DU KETCHUP SUR L'EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE, DANS LES CONDITIONS DU DÉNOMBREMENT SELON LA MÉTHODE DU NPP

Le ketchup étant un produit acide, possédant un pH de  $3.6 \pm 0.2$ , il était intéressant de déterminer l'influence de celui-ci dans les conditions du dénombrement de la méthode NPP. Le test s'est porté sur le dénombrement de *Salmonella typhimurium* pour lequel de l'eau peptonée tamponnée est utilisée en guise de bouillon nutritif. Les analyses ont été réalisées comme suit.

Dans un premier temps, 1.15 g de ketchup, à température ambiante, sont introduits dans un tube de 9 ml de BPW, la suspension est homogénéisée puis le pH est mesuré. Ceci correspond à la dilution  $10^0$ .

Dans un deuxième temps, 1.15 g de ketchup, à température ambiante, sont introduits dans un tube de 9 ml d'eau physiologique, la suspension est homogénéisée puis le pH est mesuré. Ceci correspond à la dilution  $10^{-1}$ .

Dans un troisième temps, 1 ml de la dilution  $10^{-1}$  est introduite dans un tube de 9 ml d'eau physiologique, la suspension est homogénéisée puis le pH est mesuré. Ceci correspond à la dilution  $10^{-2}$ .

La même procédure a été effectuée mais avec du ketchup chauffé à 50°C. Chaque analyse est répétée trois fois.

### 3.2.8 DÉTERMINATION DE LA VISCOSITÉ DU KETCHUP EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE

Etant donné qu'une température critique de pasteurisation est à déterminer, il s'est avéré intéressant de connaître la viscosité du ketchup à cette nouvelle température. Pour réaliser ces tests de viscosité, le rhéomètre de couette cylindrique a été utilisé en travaillant avec un cisaillement imposé. Les paramètres figurant dans le tableau 8 ont servi à créer la méthode utilisée.

**Tableau 8 :** Paramètres de la méthode pour les différents tests de viscosité

Paramètres	Valeurs
Profile de température	20°C à 90°C
Temps de l'analyse	3300 secondes
Nombre de mesures	190
Taux de cisaillement	5-20-80-140 et 500 seconde <sup>-1</sup>

L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que l'appareil effectue lui-même l'augmentation progressive de la température en fonction d'un cisaillement donné. Il est donc possible de constater des différences de viscosité pour de faibles écarts de températures.



## 4 RÉSULTATS

### 4.1 INFLUENCE DU KETCHUP, À COURT TERME, SUR LA VITALITÉ DES SOUCHES

La survie du nombre de germes inoculés dans le ketchup a été analysée pour trois souches. Etant donné un temps de contact d'environ 20 minutes, lors de l'inoculation de la souche dans le ketchup, il a été possible d'observer une diminution du nombre de germes par rapport au  $N_0$  de la suspension bactérienne. Les essais ont été réalisés sur 2 jours, un seul échantillon est analysé par souche et seule la souche *Salmonella typhimurium* est analysée deux fois en un jour, soit cinq heures après l'inoculation du ketchup, conformément à la méthode décrite sous 3.2.4. Les résultats principaux sont illustrés ci-dessous alors que le détail des calculs se trouve à l'annexe [III].

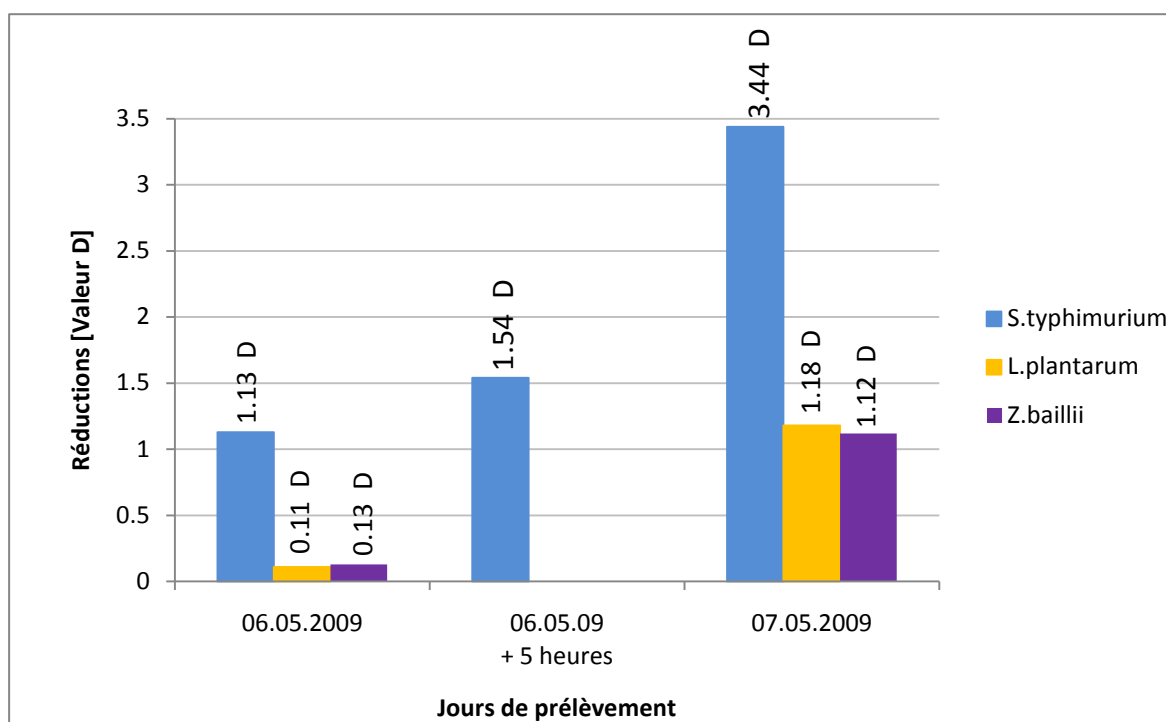


Figure 6 : Réductions obtenues en fonction des souches, pour l'influence du ketchup, à court terme

La figure 6 présente les réductions obtenues pour chaque souche en fonction du moment de prélèvement. Elle montre que les réductions les plus importantes sont obtenues pour *S. typhimurium* ( $N_0 = 1.7E+11$ ), en effet, il est possible d'observer une réduction de 3.44D après 24 heures dans le ketchup alors que les deux autres souches affichent des réductions bien plus faibles, 1.18D pour *L. plantarum* ( $N_0 = 1.5E+11$ ) et 1.12D pour *Z. baillii* ( $N_0 = 8.8E+9$ ).

## 4.2 SUIVI DE L'ÉVOLUTION DES SPORES ET DE LEURS GERMES VÉGÉTATIFS DANS LE KETCHUP

### 4.2.1 DÉNOMBREMENT DES DIFFÉRENTES SUSPENSIONS DE SPORES OBTENUES

Dans le cadre du suivi de l'évolution des spores dans le ketchup, trois suspensions ont été utilisées. Le nombre initial de germes présents dans chacune est illustré dans le tableau 9, les détails de calculs se trouvent aux annexes [IV], [V] et [VI] :

**Tableau 9** : Concentration initiale de spores dans chaque suspension

Suspension de spores de souches sauvages de/des :	No [ufc/ml]
<i>Bacillus cereus</i> , préparée le 14.05.09	7.2E+07
<i>Bacillus cereus</i> , préparée le 09.06.09	6.6E+08
Epices, préparée le 09.06.09	6.1E+09

Les suspensions obtenues d'après la méthode 3.2.2, ont été utilisée de la même manière pour les trois suivis effectués.

### 4.2.2 ÉVOLUTION DES SPORES ET DE LEURS GERMES VÉGÉTATIFS DANS LE KETCHUP

Afin de procéder au suivi du comportement des spores et de leurs germes végétatifs dans le ketchup, il a été décidé que celui-ci devait posséder une concentration initiale de spores d'environ  $10^4$  ufc/g. Le tableau 10 présente les concentrations initiales en spores, présumées et effectives, en fonction de chaque suspension. Les précisions, concernant les dilutions effectuées, la masse de ketchup considérée et le volume prélevé de chaque suspension, nécessaire au calcul du  $N_0$  présumé, sont détaillées en début des annexes [IV], [V] et [VI].

**Tableau 10** : Concentrations initiales, présumées et effectives présentes dans le ketchup

Suspension de spores	$N_0$ présumé dans le ketchup [ufc/g]	$N_0$ effectif dans le ketchup [ufc/g]
<i>B. cereus</i> (14.05.09)	1.2E+04	4.3E+04
<i>B. cereus</i> (09.06.09)	1.1E+04	2.0E+04
Epices (09.06.09)	1.0E+04	7.1E+04

Les manipulations ont été réalisées de sorte que chaque bouteille de ketchup ait un nombre initial de spores pratiquement identique, ce qui facilite l'observation de leurs comportements respectifs. Il est à remarquer que les  $N_0$  présumés, obtenus par calcul et décrits au tableau 10, sont plus faibles que les nombres de germes dénombrés au jour 0, après l'inoculation du ketchup. Les figures 7, 8 et 9 illustrent l'évolution des spores et de leurs germes végétatifs, pour chaque souche dans le ketchup, en fonction du temps. Les valeurs intermédiaires permettant la construction des graphiques, se trouvent aux annexes [IV], [V] et [VI].

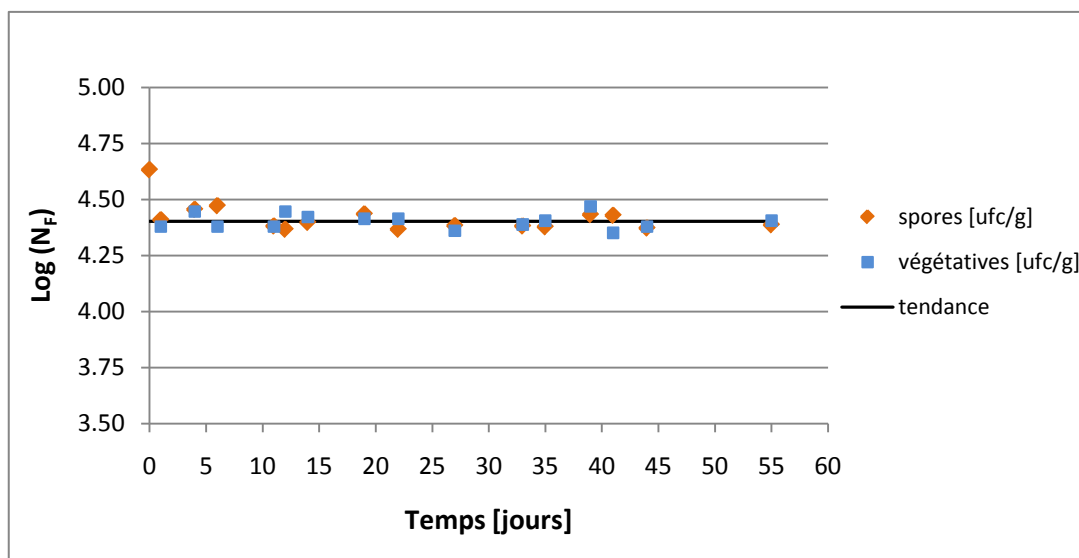


Figure 7 : Suivi de l'évolution des spores de souche sauvage de *Bacillus cereus* (14.05.09)

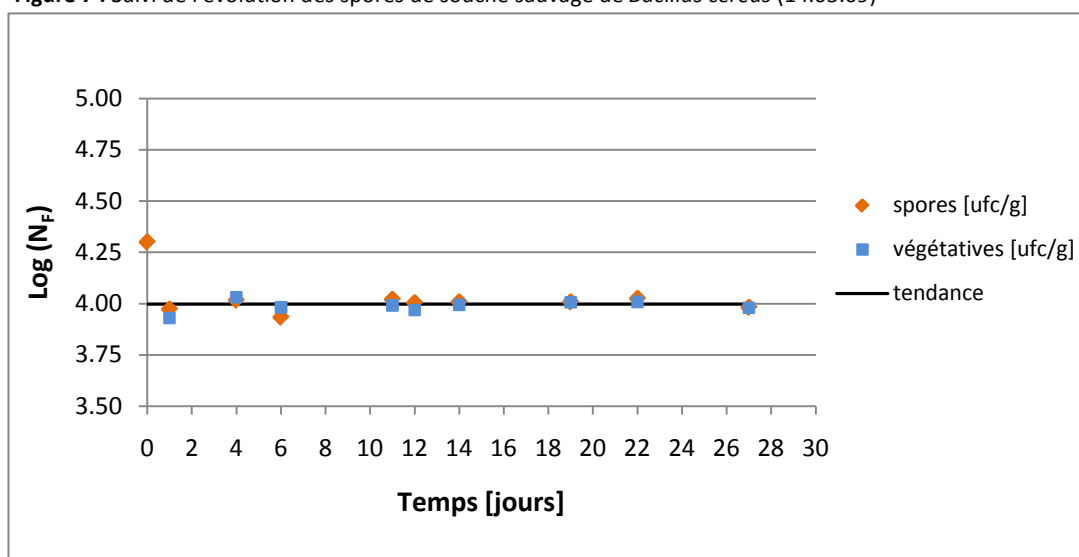


Figure 8 : Suivi de l'évolution des spores de souches sauvages isolées des épices (09.06.09)

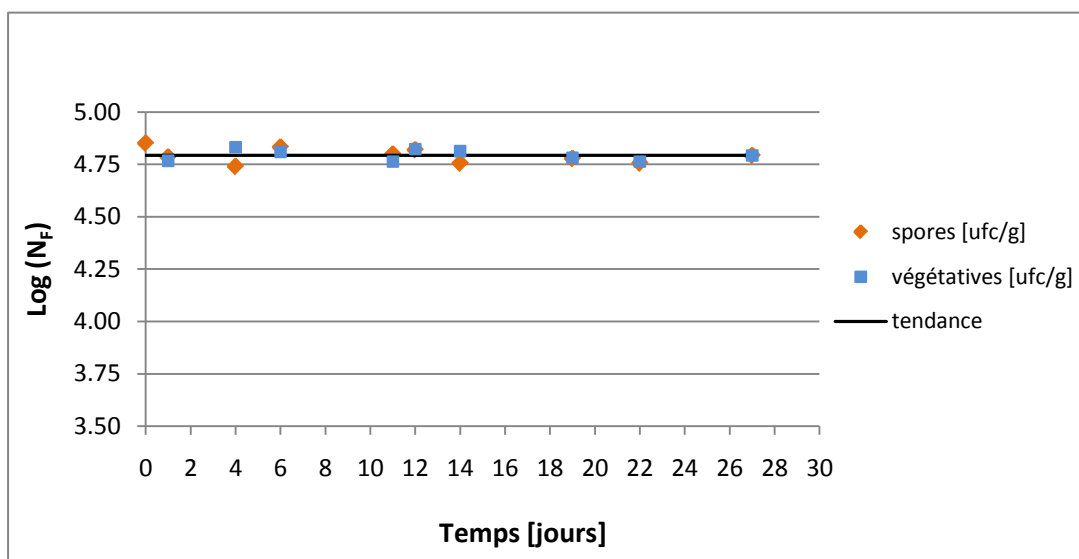


Figure 9 : Suivi de l'évolution des spores de souche sauvage de *Bacillus cereus* (09.06.09)

Ces trois figures montrent clairement que les spores restent à l'état de spores dans le ketchup et que leur germination n'est pas possible. Il n'y a ni diminution du nombre de spores, ni augmentation du nombre de cellules végétatives. En effet, toutes les figures présentent la même constance. Le tableau 11 met en évidence cette tendance, il expose la valeur moyenne et l'écart-type des différents logarithmes, obtenus pour les nombres finaux des spores et des germes végétatifs.

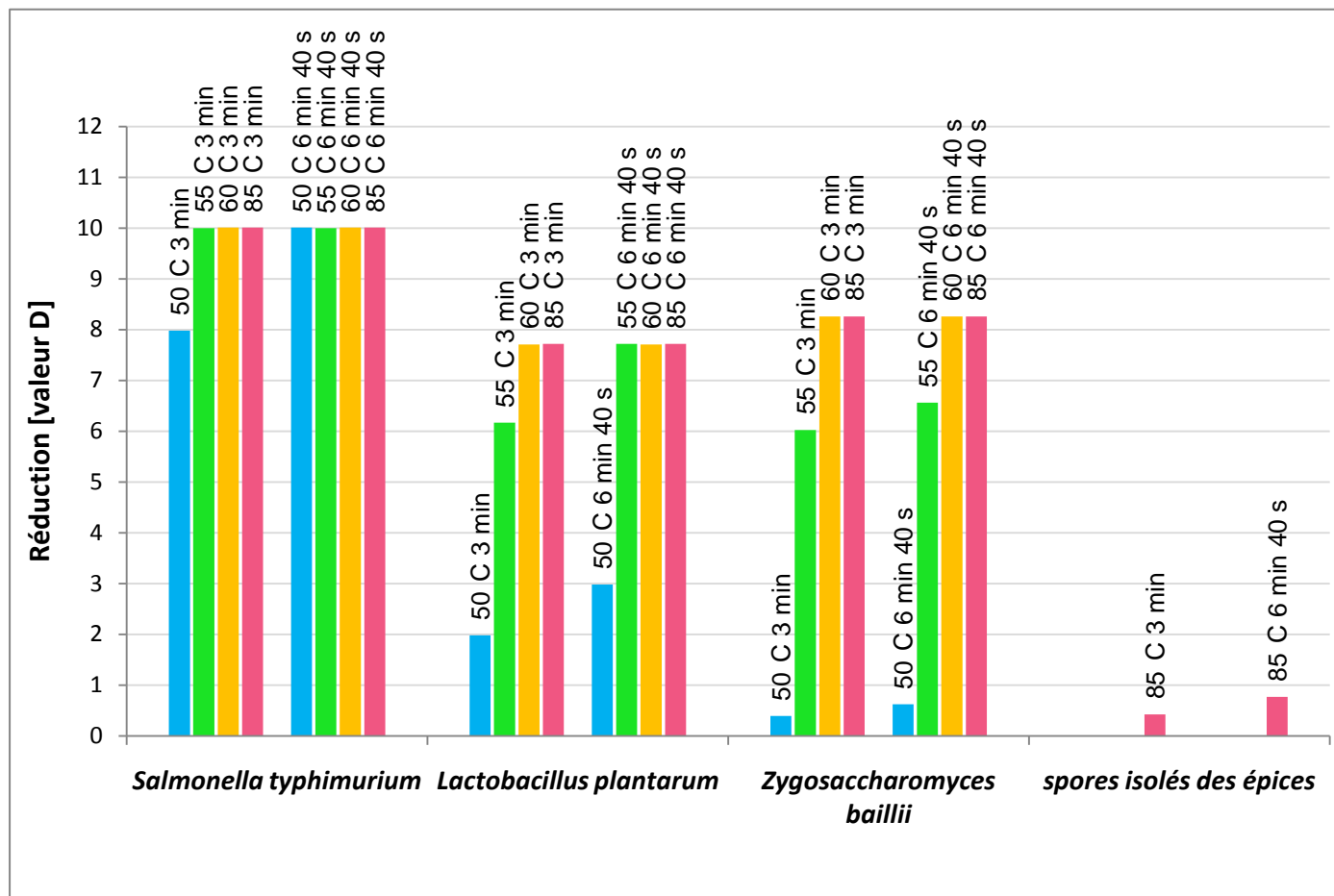
**Tableau 11 :** Moyenne et écart-type des logarithmes obtenus pour les spores et les germes végétatifs

Spores provenant de/des :	Log (N <sub>F</sub> ) spores	Log (N <sub>F</sub> ) végétatives
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
<i>Bacillus cereus</i> (14.05.09)	4.40 ± 0.03	4.40 ± 0.03
<i>Bacillus cereus</i> (09.06.09)	4.78 ± 0.03	4.79 ± 0.03
Epices (09.06.09)	4.00 ± 0.03	3.99 ± 0.03

Les moyennes des différents logarithmes sont comprises dans une fourchette relativement petite bien que les suspensions soient de souches différentes. Les résultats des spores et celui des germes végétatifs sont pratiquement identiques. C'est pour cette raison, que les tendances présentées aux figures 7, 8 et 9 sont inspirées de la moyenne des valeurs du tableau 11, en fonction de la souche. Les écarts-types, quant à eux, sont tous égaux et relativement faibles ce qui confirme la constance des résultats, relevée plus haut.

### 4.3 PASTEURISATION DU TOMATO KETCHUP

Les pasteurisations effectuées au laboratoire ont, dans un premier temps, été réalisées à double pour chaque souche, puis les pasteurisations ont été renouvelées dans le temps, toujours à double pour chaque souche. Les différents résultats présentés à la figure 10 ainsi qu'au tableau 12, ont été obtenus conformément à la méthode 3.2.6.



**Figure 10 :** Récapitulatif des diverses réductions obtenues en fonction de la souche, de la température et de la durée de pasteurisation

Les réductions obtenues mettent en évidence que les germes d'altération, à savoir, *L.plantarum* et *Z.baillii* ont une résistance générale plus grande vis-à-vis des conditions de pasteurisation que le germe pathogène représenté par *S.typhimurium*. En effet, les réductions maximales obtenues pour *L.plantarum* et *Z.baillii*, dans les conditions les moins sévères (50°C/3minutes) sont de 2.0D et 0.4D alors que la réduction maximale dans les mêmes conditions pour *S.typhimurium* est de 8.0D.

La sécurité du procédé de pasteurisation étant assurée avec une réduction supérieure ou égale à 6D, il est possible de dire que vis-à-vis des germes pathogènes, un traitement de trois minutes à 50°C suffit (8.0D) alors que pour les germes d'altération, un traitement de trois minutes à 55°C est nécessaire (>6.2D pour *L.plantarum* et 6.0D pour *Z.baillii*). Les spores, quand à eux, présentent des réductions insignifiantes (0.4D et 0.8D) par rapport à la température la plus élevée.

Le tableau 12 présente le nombre de germe initiales  $N_o$ , le nombre de germes finales  $N_F$  et les réductions obtenus pour la pasteurisation en fonction des quatre températures testées et des quatre souches. Pour des raisons pratiques, seules les moyennes des différentes valeurs, sont présentées ci-dessous, les détails de calculs se trouvent aux annexes [VII], [VIII], [IX] et [X].

**Tableau 12 :** Résultats de la pasteurisation pour les quatre températures testées, les deux temps de traitement et les quatre souches choisies

Souches	Températures [°C]	$N_o$ dans le ketchup [ufc/g]	Log $N_o$	<sup>9</sup> * $N_F$ [ufc/g] / NPP		*log ( $N_F$ ) / log(NPP)		Réductions [Valeur D]	
				3 min.	6 min.40 s	3 min.	6 min.40 s	3 min	6 min.40 s
<i>L.plantarum</i>	50	1.57E+07	7.20	*1.63E+05	*1.63E+04	*5.21	*4.22	2.0	3.0
	55	1.58E+07	7.20	10.73	<0.3	1.03	<-0.52	>6.2	>7.7
	60	1.56E+07	7.19	<0.3	<0.3	<-0.52	<-0.52	>7.7	>7.7
	85	1.58E+07	7.20	<0.3	<0.3	<-0.52	<-0.52	>7.7	>7.7
<i>S.typhimurium</i>	50	3.05E+09	9.48	32.40	<0.3	1.5	<-0.52	8.0	10.0
	55	3.00E+09	9.48	<0.3	<0.3	<-0.52	<-0.52	>10.0	>10.0
	60	3.04E+09	9.48	<0.3	<0.3	<-0.52	<-0.52	>10.0	>10.0
	85	3.04E+09	9.48	<0.3	<0.3	<-0.52	<-0.52	>10.0	>10.0
<i>Z.baillii</i>	50	5.39E+07	7.73	*2.19E+07	*1.31E+07	*7.34	*7.12	0.4	0.6
	55	5.32E+07	7.73	50.25	14.63	1.7	1.17	6.0	6.6
	60	5.41E+07	7.73	<0.3	<0.3	<-0.52	<-0.52	>8.3	>8.3
	85	5.37E+07	7.73	<0.3	<0.3	<-0.52	<-0.52	>8.3	>8.3
Spoires isolées des épices	85	9.75E+07	7.99	*3.75E+07	*1.67E+07	*7.57	*7.22	0.4	0.8

Les spores, utilisées pour ces essais de pasteurisation, représentent les souches sauvages provenant des épices et ont été préparées selon la méthode 3.2.2. Les résultats intermédiaires, répertoriés dans le tableau 12 et ayant permis de construire la figure 10, sont considérés comme répétables et reproductibles, la méthode utilisée étant valable.

<sup>9</sup> \* : l'astérisque présent dans le tableau 12 indique que le résultat pour le nombre de germe final a été déterminé par dénombrement sur gélose et non par la méthode du NPP, comme décrit par la méthode 3.2.6.



#### 4.4 INFLUENCE DU KETCHUP SUR L'EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE, DANS LES CONDITIONS DU DÉNOMBREMENT DE LA MÉTHODE DU NPP

La figure 11 met en évidence le pH de l'eau peptonée tamponnée et de l'eau physiologique, utilisées pour le dénombrement de *Salmonella typhimurium*, dans le cadre de la méthode du NPP. Chaque pH est mesuré à triple et deux échantillons sont analysés par dilution, à savoir un échantillon chauffé (Température=50°C) et un échantillon à température ambiante ( $T^{\circ}\text{C}_{\text{moyenne}}=23.5^{\circ}\text{C}$ ). Les tests ont été réalisés d'après la méthode 3.2.7. Le détail des calculs se trouve à l'annexe [XI].

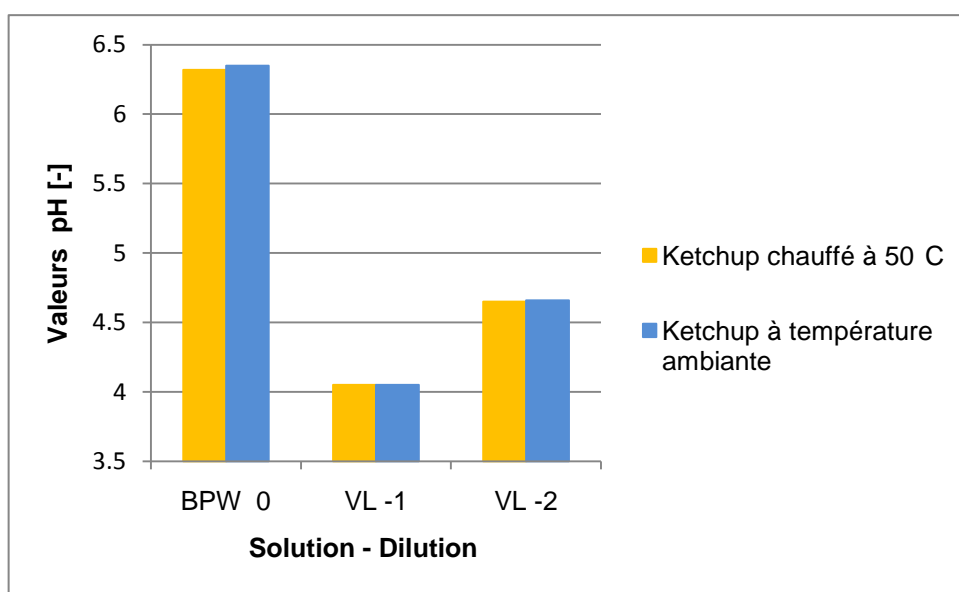


Figure 11: Valeurs des différents pH mesurés en fonction de la nature du solvant et de sa dilution

Le fait que le ketchup soit chauffé ou non n'a pas d'influence significative sur le résultat du pH. Le pH initial du BPW est de 6.96 à 23.5°C, cette valeur est pratiquement identique au pH du VL seul, qui est de 7.00, pour la même température. Une fois le ketchup ajouté à ces deux solutions, le pH varie passablement. Les tubes de BPW 0 (Peptone Water Buffered – dilution  $10^0$ ) et de VL -1 (eau physiologique – dilution  $10^{-1}$ ), ont reçu la même quantité de ketchup, pourtant le pH du mélange montre une différence nette. En effet, une moyenne de 6.34 pour le BPW 0 est constatée par rapport à 4.05 pour le VL -1. Le pH de la dilution -2 du VL est quant à lui de 4.66.

#### 4.5 DÉTERMINATION DE LA VISCOSITÉ DU KETCHUP EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE

Une analyse de la viscosité du ketchup a été réalisée afin de déterminer l'influence de la température de pasteurisation sur la texture du produit. Différents taux de cisaillement ont été testés pour une gamme de température fixe allant de 20°C à 90°C.

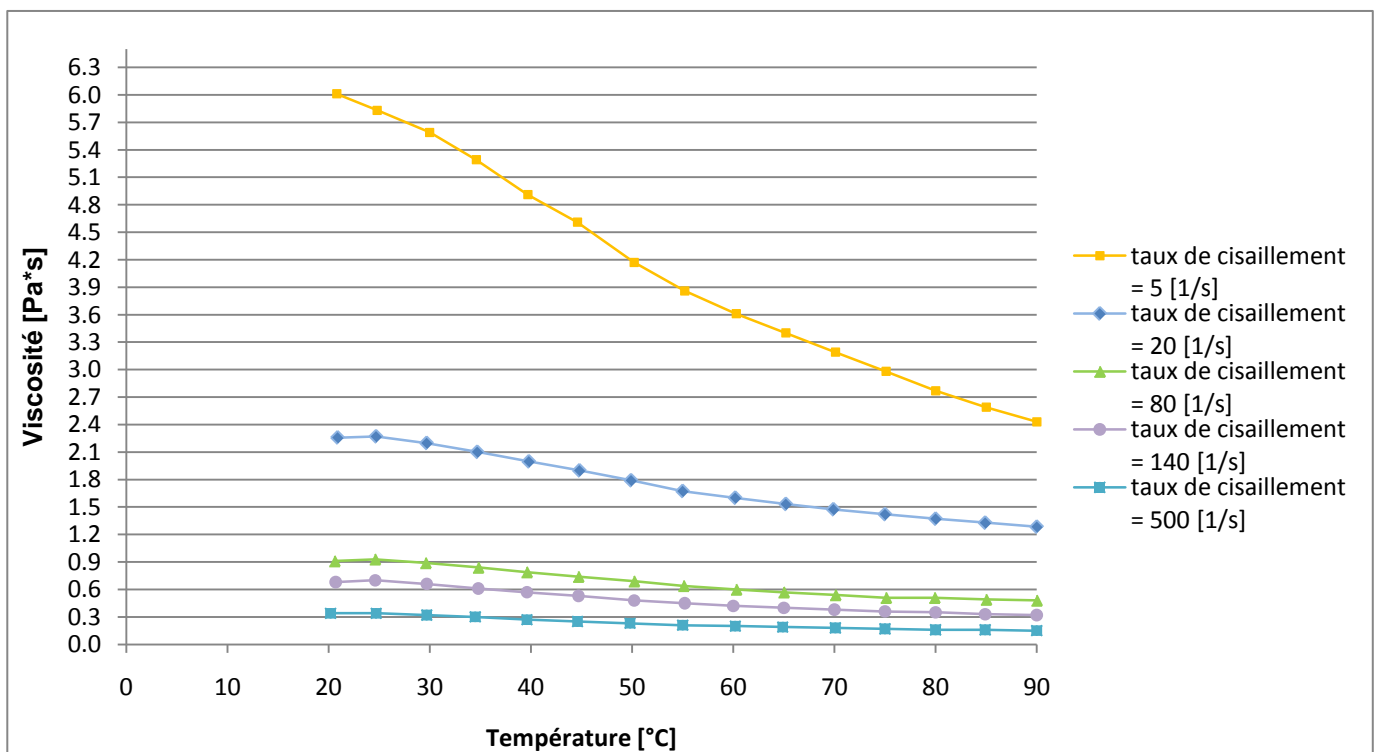


Figure 12 : Courbe de viscosité en fonction du taux de cisaillement et de la température de l'essai.

La figure 12 expose clairement l'influence du taux de cisaillement sur la viscosité du produit. En effet, plus le taux de cisaillement est élevé, moins la température a d'effet sur la viscosité. Ceci se remarque bien sur le graphique, car les courbes présentées pour un taux de cisaillement de 80, 140 et 500 [1/s], ont une allure similaire à une droite. Par exemple, pour une température de 85°C et un taux de cisaillement maximal, la viscosité est de 0.16 Pa\*s alors qu'elle est de 0.2 Pa\*s pour une température de 60°C et un taux de cisaillement identique, la différence de viscosité n'est donc pas significative.

#### **4.6 ANALYSE EXHAUSTIVE DES DANGERS POUR LA PRODUCTION DU TOMATO KETCHUP HOT, SELON LA NORME ISO 22000:2005**

Les analyses des dangers, présentées sous les points 4.6 et 4.7, ont été réalisées, principalement, grâce aux informations récoltées sur le site d'Aigle de l'entreprise Hugo Reitzel. Les renseignements fournis par les diagrammes de flux de fabrication, les arbres de décisions proposées par l'organisme certificateur ProCert<sup>[4],[5]</sup> ainsi que l'exploitation des différentes littératures, existantes sur le sujet, constituent les outils nécessaires ayant permis d'effectuer ces analyses exhaustives des dangers. Les différents tableaux qui suivent et qui concernent aussi bien le *Tomato ketchup hot* que la sauce *french dressing aux herbes*, s'organisent en différents formulaires. Tout d'abord un formulaire général, FO1 qui correspond à l'analyse des dangers, puis un formulaire FO2 qui présente la maîtrise des CCP et enfin un formulaire FO3 qui indique les détails pour la maîtrise des oPRP.

**FO1 :**

Etape		Evaluation des dangers						Mesures de maîtrise
N°	Matière / processus	Description des dangers	Présence / Contamination/ Recontamination/ Survie/Croissance	Origine / Cause Vecteur / Conditions	Significatif	Justification	Documents/ Littérature	PRP / Spécification / Analyse de la matière première / CCP/ Modifications
1	Vinaigre et saumure pour moutarde Réception	Corps étrangers non métalliques	Contamination	Palette - plastique/Hygiène générale	non	Le vinaigre et la saumure sont des produits maisons qui sont soumis à des contrôles en amont. Il est peu probable qu'un corps étrangers entre en contact avec le produit selon l'expérience de la filtration des cinq dernières années	p-5601 et p-5600	Filtration avec un filtre de diamètre < 1.5 mm BPF <b>oPRP</b>
2	Concentré de tomate pasteurisé Réception	Résidus de pesticides	Présence	Traitement des plants de tomates	non	Valeurs légales respectées par le fournisseur  Aucun problème connu sur l'expérience des cinq dernières années	Littérature 13	Programme d'agriculture raisonnée, BPAgricole  Spécification fournisseur et système de référencement des analyses externes  <b>oPRP</b>
		Mycotoxines	Présence	Champignon indigène de la tomate	non	Valeurs légales respectées par le fournisseur  Aucun problème connu sur l'expérience des cinq dernières années	Littérature 11-11*	BPF-H chez le fournisseur Spécification et système de référencement des analyses externes  <b>oPRP</b>
3	Epices (poivre de Cayenne et poivre blanc moulu) Réception	Spores de <i>B.cereus</i> et <i>C.perfringens</i>	Présence	Sol - état hygiénique pas optimale	oui	Les épices sont soumises à des contrôles en amont.  Les spores résistent au séchage et au stockage dans les épices mais le pH du produit est trop faible pour qu'elles puissent germer.	Littérature 5  Résultats des tests effectués par Reitzel et conclusions TD	Spécification fournisseur  Le pH de l'étape 17 est vérifié et le produit n'est pas conditionné si le pH n'est pas validé.
		Mycotoxines	Présence	Champignon indigène du poivre (graines)	non	Valeurs légales respectées par le fournisseur  Aucun problème connu sur l'expérience des cinq dernières années	Littérature 11	BPF-H chez le fournisseur et spécification fournisseur
		Résidus de pesticides	Présence	Traitement (Fumigants-chlorhydrines)	non	Valeurs légales respectées par le fournisseur  Aucun problème connu sur l'expérience des cinq dernières années	Littérature 13	Programme d'agriculture raisonnée, BPAgricole et spécification fournisseur

**FO1 :**

Etape		Evaluation des dangers						Mesures de maîtrise
N°	Matière / processus	Description des dangers	Présence / Contamination/ Recontamination/ Survie/Croissance	Origine / Cause Vecteur / Conditions	Significatif	Justification	Documents/ Littérature	PRP / Spécification / Analyse de la matière première / CCP/ Modifications
5	Vinaigre et saumure pour moutarde Stockage tank 2-3 et 5	Corps étrangers non métalliques	Contamination	Palette - plastique/Hygiène générale	non	Le produit est pompé dans des conduites aérienne et est amené directement dans les bacs de stockage ce qui exclu une contamination, selon l'expérience des cinq dernières années	-	BPF-H de Reitzel
6	Concentré de tomate Dépotage	Corps étrangers non métalliques	Contamination	Morceaux de sacs	non	Si un morceau de sac se retrouve dans le produit, il est probable que le morceau se retrouve dans une bouteille de ketchup.  Aucun problème connu sur l'expérience des cinq dernières années	-	BPF-H de Reitzel
11	Epices (poivre de Cayenne et poivre blanc)/ Aux.technologiques (amidon)  Stockage bacs plastiques	Corps étrangers non métalliques	Contamination	Contenants/ environnement	non	Il est peu probable qu'un corps étrangers entre en contact avec le produit selon l'expérience des cinq dernières années	-	Validation du nettoyage en place  BPF-H
12-13	Saumure/sirop de glucose-fructose/ Epices-arômes-aux.technologiques/ Concentré de tomate/ Vinaigre/ Eau  Mélange tank 10-Stokage tank 20	Corps étrangers non métalliques	Contamination	Contenants/ environnement	non	Il est peu probable qu'un corps étrangers entre en contact avec le produit selon l'expérience des cinq dernières années	-	Validation du nettoyage en place  BPF-H
		Allergènes présents dans les sauces	NEP des cuves non effectué après production de sauces contenant des allergènes	Contamination croisée	non	L'ordre de passage des différentes sauces est déterminé de telle façon que les substances allergènes ne peuvent se retrouver dans le mauvais produit. Si l'ordre de passage ne peut être suivi, un NEP est automatiquement réalisé.	Plan de fabrication/ passage des diverses sauces  I-5046	Validation du nettoyage en place-Respect de l'ordre du plan de passage définit  <b>oPRP</b>

**FO1 :**

Etape		Evaluation des dangers						Mesures de maîtrise
N°	Matière / processus	Description des dangers	Présence / Contamination/ Recontamination/ Survie/Croissance	Origine / Cause Vecteur / Conditions	Significatif	Justification	Documents/ Littérature	PRP / Spécification / Analyse de la matière première / CCP/ Modifications
14-15	Contenu du tank 20 Pasteurisation Contherm-circulation du produit	<i>Salmonella spp.</i>	Survie	Barème de pasteurisation insuffisant-soupape de sécurité défectueuse	oui	Bactérie pathogène qui peut présenter un danger pour la santé du consommateur bien qu'avec les conditions d'acidité du produit elle ne puisse atteindre un niveau de croissance inacceptable.	Littérature 4-4*** PC	Le barème de pasteurisation (60°C/400 secondes) est adapté et assuré.  La soupape de sécurité garantit la circulation du produit à la bonne température durant un temps définit. Cette soupape est munie d'un système d'alarme.  <b>CCP</b>
17	Produit pasteurisé Stockage tank 40-41 (< 12heures)	Allergènes présents dans les sauces	NEP des cuves non effectué après production de sauces contenant des allergènes	Contamination croisée	non	L'ordre de passage des différentes sauces est déterminée de telle façon que les substances allergènes ne peuvent se retrouver dans le mauvais produit. Si l'ordre de passage ne peut être suivi, un NEP est automatiquement réalisé.	Plan de fabrication/ passage des diverses sauces I-5046	Validation du nettoyage en place-Respect de l'ordre de passage définit  <b>oPRP</b>
		Corps étrangers non métalliques	Contamination	Contenants/ environnement	non	Il est peu probable qu'un corps étrangers entre en contact avec le produit selon l'expérience des cinq dernières années	-	Validation du nettoyage en place  BPF-H
		Spores de <i>B.cereus</i> et <i>C.perfringens</i>	Présence-germination	Epices	oui	Il est peu probable que le pH du produit varie d'une fois à l'autre étant donné que le vinaigre est fabriqué par Reitzel et que c'est principalement lui qui détermine le pH du produit. La germination est peu probable au vu du faible pH selon l'expérience des cinq dernières années	Littérature 5-5**	Acidification  <b>oPRP</b>

**FO1 :**

Etape		Evaluation des dangers						Mesures de maîtrise
N°	Matière / processus	Description des dangers	Présence / Contamination/ Recontamination/ Survie/Croissance	Origine / Cause Vecteur / Conditions	Significatif	Justification	Documents/ Littérature	PRP / Spécification / Analyse de la matière première / CCP/ Modifications
18	Contenu du tank 40-41 Remplissage (squezze)	Allergènes présents dans les sauces	NEP de la remplisseuse non effectué après production de sauces contenant des allergènes	Contamination croisée	non	L'ordre de passage des différentes sauces est déterminé de telle façon que les substances allergènes ne peuvent se retrouver dans le mauvais produit. Si l'ordre de passage ne peut être suivi, un NEP est automatiquement réalisé.	Plan de fabrication/ passage des diverses sauces I-5046	Validation du nettoyage en place-Respect de l'ordre de passage définit  <b>oPRP</b>
		Entérobactéries- <i>Staphylococcus aureus</i>	Contamination	Bouteilles contaminées lors de la manutention/ air ambiant	non	Bactéries indicatrice et pathogène qui peuvent présenter un danger pour le consommateur. Pas d'étape en aval qui permettent de ramener le risque à un niveau acceptable si ce n'est le milieu qui ne permet pas une contamination inacceptable du produit.	Littérature 9	Remplissage sous flux laminaire et BPH  <b>oPRP</b>
19	Détection de métaux	Corps étrangers métalliques non décelés	Persistence	Métal provenant d'une cuve,tank, outil, ustensils	oui	Une fois fermée, la bouteille ne subit plus d'examen et il y a donc un risque pour la santé du consommateur	P-5604	Passage des bouteilles sous le détecteur de métaux qui déclenche une alarme au passage de métal  <b>CCP</b>

**FO2 :**

Etape		CCP					Actions correctives		Responsabilité
N°	Matière / Process	Mesure de maîtrise	Niveau acceptable	Seuil critique	Procédure de surveillance	Fréquence	Activité	Fréquence	
	Danger significatif								
14	Pasteurisation Contherm	Barème de pasteurisation (60°C pendant 400 secondes)	Réduction de minimum 6D	60°C/ 3 minutes	Sonde de température intégrée au Contherm et reliée au PC qui retranscrit le barème.	En continu	Vanne automatique qui ne libère pas le produit tant que la T°C fixée n'est pas atteinte	Continu	Chef d'atelier
	<i>Salmonella spp.</i>								
19	Détection de métaux	Passage des bouteilles sous le détecteur de métaux qui déclenche une alarme au passage de métal  Vérification journalière de l'étalonnage avant le début des opérations et signature de la fiche de contrôle.	Absence de métal	Ferreux et non ferreux : 2.5 mm  Inox : 5 mm	Carte de détection témoin qui assure le bon fonctionnement du détecteur	1 fois/heure	Identifier le lot et le repasser au détecteur	A chaque fois qu'il y a erreur	Opérateur
	Présence de morceaux de métal non décelés								



**FO3 :**

Etape		oPRP				Actions correctives		Responsabilité
N°	Matière / Process	Mesure de maîtrise	Niveau acceptable	Procédure de surveillance	Fréquence	Activité	Fréquence	
	Danger significatif							
1	Réception du vinaigre et de la saumure pour moutarde	Filtration avec filtre de diamètre < 1.5 mm	Particule < 1.5 mm	Vérification du filtre	Mensuel	Nettoyer le filtre ou le changer	Si besoin est	Contre-maître
	Corps étrangers non métalliques							
2	Réception du concentré de tomate pasteurisé	Bonnes pratiques agricoles	OSEC	Résultats des analyses externes	1 fois par an	Renforcer les contrôles	Si besoin est Plus d'une fois par an	Responsable qualité
	Résidus de pesticides	Contrats avec les producteurs	Littérature 17					
2	Réception du concentré de tomate pasteurisé	Bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène	Etat de trace	Résultats des analyses externes	1 fois par an	Renforcer les contrôles	Plus d'une fois par an	Responsable qualité
	Mycotoxines	Contrats avec les producteurs		Screening général				

FO3 :

Etape		oPRP				Actions correctives		Responsabilité
N°	Matière / Process	Mesure de maîtrise	Niveau acceptable	Procédure de surveillance	Fréquence	Activité	Fréquence	
	Danger significatif							
12-13 17-18	Mélange, stockage des ingrédients et remplissage du produit pasteurisé	Validation du nettoyage en place	NEP validé et absence d'allergène	P-5596	Après chaque production, à chaque fois que le produit change	Procéder à nouveau au nettoyage et le valider	Si besoin est	Opérateur
	Allergènes présents dans les sauces							
17	Stockage avant remplissage	Acidification	pH<4	Contrôle du pH	1 fois/heure	Si le pH n'est pas inférieur à 4 il faut stopper le remplissage et ne pas libérer le lot	Si besoin est	Opérateur
	Spoires de <i>B.cereus</i> et <i>C.perfringens</i>							
18	Remplissage	Remplissage sous flux laminaire	Ohyg Littérature 21	Analyse des germes dans l'air du flux laminaire	Mensuel	Changer les filtres, désinfecter l'espace de remplissage	Si besoin est	Opérateur
	Entérobactéries- <i>Staphylococcus aureus</i>							

#### **4.7 ANALYSE EXHAUSTIVE DES DANGERS POUR LA PRODUCTION DE LA SAUCE *FRENCH DRESSING* AUX HERBES, SELON LA NORME ISO 22000:2005**

Les données concernant l'analyse des dangers de la sauce dressing sont confidentielles et appartiennent à la maison Hugo Reitzel.

## 5 DISCUSSION

### 5.1 INFLUENCE DU KETCHUP, À COURT TERME, SUR LA VITALITÉ DES SOUCHES

Les essais de pasteurisation se devant d'être répétables et reproductibles, un grand nombre d'essais étaient à réaliser. En ce sens, la question de l'utilisation de souches fraîchement préparées ou, non, s'est posée. Les différents tests effectués devaient mettre en évidence la possibilité de stocker à température ambiante, une petite quantité de ketchup déjà inoculé, afin de l'utiliser comme inoculât lors des essais de pasteurisation. Il s'agissait donc d'observer le comportement de la concentration bactérienne du mélange, le jour et le lendemain de l'inoculation. Il s'est avéré que l'influence du ketchup était trop grande pour que ce stockage puisse être mis en place.

En effet, la souche *S.typhimurium*, représentante des germes pathogènes, subit d'importantes réductions après cinq heures déjà et au lendemain de l'inoculation la réduction a plus que triplé (1.13D à 3.44D). Par contre les deux autres souches, représentantes des germes d'altération montre une plus grande résistance vis-à-vis du milieu qu'est le ketchup. *Z.baillii* (0.11D à 1.12D) et *L.plantarum* (0.11D à 1.18D), présentent un comportement quasi identique par rapport à la matrice qu'est le ketchup. En effet, les réductions mesurées après inoculation sont très faibles mais au lendemain de celle-ci, les réductions obtenues se révèlent être dix fois plus élevées.

Au vu des résultats, il a été décidé d'abandonner l'idée du stockage de germes dans le milieu de pasteurisation pour préférer une inoculation directe de la suspension bactérienne dans le ketchup à pasteuriser. Ainsi les trois souches utilisées pour contaminer le produit, sont préparées et utilisées de la même manière.

## 5.2 SUIVI DE L'ÉVOLUTION DES SPORES ET DE LEURS GERMES VÉGÉTATIFS DANS LE KETCHUP

### 5.2.1 ISOLATION DE SPORES DE SOUCHES SAUVAGE PROVENANT DES ÉPICES

Des spores ont voulu être isolées du poivre blanc et du poivre de Cayenne qui sont les représentants des épices du ketchup. Ces spores sont indigènes au produit et sont donc susceptibles de posséder une résistance plus importante vis-à-vis de la chaleur qu'une espèce provenant d'une collection. Il est ainsi intéressant de travailler avec ces souches sauvages dans le cadre des essais de pasteurisation afin de tester les différentes températures définies sur les spores, qui ont une forte probabilité de se trouver dans ces matières premières.

Aucune identification, à proprement parlé, n'a été réalisée, cependant, au vu des caractéristiques constatées sur les colonies provenant du poivre de Cayenne et du poivre blanc, il est fort probable que les bactéries soient du genre *Bacillus*. En effet, les colonies observées étaient circulaires, de forme irrégulières avec des bords ondulés, un aspect mat et présentant des spores terminales<sup>[24]</sup>.

### 5.2.2 EVOLUTION DES SPORES ET DE LEURS GERMES VÉGÉTATIFS DANS LE KETCHUP

Il est indispensable d'effectuer le suivi de la croissance des spores dans le ketchup, afin d'observer leurs évolutions et leurs réactions par rapport à l'acidité. La pasteurisation n'éliminant pas les spores, leurs maîtrises passent par le contrôle de l'acidité du produit. L'ingestion des spores de *Bacillus cereus*, en elle-même, n'est pas dangereuse, mais l'ingestion de spores germinantes, susceptibles de contenir une toxine émétique provoque l'intoxication alimentaire. Il est donc nécessaire de maîtriser l'acidification du produit.

Le ketchup a été inoculé avec une concentration en spores d'environ  $10^4$  ufc/g, cette concentration permet de simuler « the worst case », c'est-à-dire un scénario catastrophe. En effet, cette concentration est très élevée et en pratique, les valeurs sont toujours plus petites, ce qui veut dire que la sécurité est d'autant plus assurée que les concentrations choisies sont importantes.

Au vu des différents suivis réalisés, aucune germination n'a été constatée, les spores restent sous forme de spores et par conséquent aucunes cellules végétatives ne se développent. Les trois figures 7, 8 et 9 présentent la même tendance, ce qui indique que deux suspensions de spores provenant de souches sauvages différentes (*Bacillus cereus* et les épices) se comportent de la même manière. Les tests effectués sont également reproductibles car les deux suspensions de souches identiques (*Bacillus cereus*) montrent également cette constance.

Le nombre de spores ainsi que le nombre de germes végétatifs dénombrés lors de chaque analyse, ne varie pas. Les éventuels écarts remarqués ne sont pas significatifs et sont à imputer aux prises d'échantillons ponctuelles, c'est-à-dire aux manipulations réalisées. Afin d'apprécier au mieux la constance des résultats, il est préférable de regarder la moyenne et l'écart-type des logarithmes obtenus pour le dénombrement des spores et de leurs germes végétatifs.

Ainsi, les résultats sont compris entre 4.00 et 4.78 pour les spores et entre 3.99 et 4.79 pour les germes végétatifs, les écarts-type, de 0.03 étant tous identiques. Ces fourchettes sont petites bien que les suspensions soient de souches différentes.

Le risque de germination de spores peut donc être écarté dans le *Tomato ketchup* étant donné que le pH de celui-ci est de  $3.6 \pm 0.2$ , ce qui est nettement inférieur au pH de 4.5, pH de référence utilisées pour l'inhibition de la germination et de la croissance des germes végétatifs<sup>[7]</sup>. Reitzel assure donc la sécurité du produit de part la composition du ketchup.

Il est à remarquer que les  $N_0$  présumés, pour la souche sauvage *Bacillus cereus*, sont plus faibles que les nombres de germes dénombrés au jour 0, après l'inoculation du ketchup. Une fois sur plaque et dans un milieu favorable, la spore laisse place à une cellule végétative. Comme mentionné plus haut, les spores en question ont un développement rapide, de ce fait, les germes végétatifs peuvent se multiplier, dans une certaine mesure, en 24 heures. Ce qui explique que les divers dénombrements effectués présentent un nombre de germes (initiaux effectifs et finaux) légèrement plus élevé que le nombre de germes initialement inoculés dans le ketchup.

### 5.3 PASTEURISATION DU TOMATO KETCHUP

La pasteurisation est un CCP dans le processus de la fabrication du ketchup. Ce traitement thermique est l'étape essentielle pour éliminer le danger que représente *Salmonella typhimurium* pour la sécurité microbiologique de cette sauce. Cette bactérie est considérée comme un danger à maîtriser par l'analyse exhaustive des dangers présentée sous 4.6. Il est important d'éviter toute post-contamination après cette étape et de respecter les bonnes pratiques de fabrication.

Au sein de l'entreprise Hugo Reitzel SA, le traitement thermique est réalisé durant 400 secondes à 85°C par un échangeur à surface raclée, comprenant deux tubes. Il faut préciser que, dans un premier temps, le produit est préchauffé à la température fixe, non modifiable de 66°C. Puis le deuxième tube de l'échangeur à surface raclée permet d'atteindre la température désirée en sortie. Dans un troisième temps, un chambreur (serpentin) garantit une durée de circulation, de 400 secondes, à la température souhaitée, normalement constante. De ce fait, il a été décidé de prélever deux échantillons par températures testées, soit un échantillon après trois minutes, ce qui représente un peu moins de la moitié du temps total de pasteurisation, et un échantillon après six minutes et 40 secondes, qui correspond aux 400 secondes de circulation.

Différents essais de pasteurisation ont été réalisés à l'échelle laboratoire sur le *Tomato ketchup* dans l'optique de diminuer la température de ce traitement thermique jusqu'à trouver la température critique de pasteurisation. Pour ce faire, trois germes ont été choisis, il s'agit de *Salmonella typhimurium*, qui représente les germes pathogènes végétatifs, et de *Lactobacillus plantarum* et *Zygosaccharomyces baillii*, qui représentent les germes d'altération. Une analyse a également été menée sur les spores de souches sauvages isolées des épices, mais uniquement sur la température de 85°C, pour la simple raison qu'il est connu que la pasteurisation n'a pas d'effet sur les formes sporulées<sup>[13]</sup>. Il a suffi de confirmer cela pour la température la plus élevée, et il n'a pas été nécessaire de tester les températures inférieures.

La méthode de dénombrement, qui a été choisie, est basée sur le nombre de germe le plus probable. La valeur obtenue représente uniquement une estimation statistique du nombre de bactéries qui, plus probablement qu'un autre, donnerait les résultats observés<sup>[16]</sup>. Il ne s'agit donc pas du nombre réel de bactéries présentes. Tous les codes obtenus dans le cadre de ces essais appartiennent à la catégorie 1, c'est-à-dire que ce sont les résultats ayant le plus de chance d'être obtenus. Il y a quatre catégories de nombre le plus probable, qui sont classées selon leur probabilité d'apparition. D'abord la catégorie 1, ensuite, les catégories 2 et 3, puis la catégorie 0, qui concerne les résultats qui n'ont qu'une chance minime d'être obtenus.

Il est intéressant de regarder de plus près les résultats moyens obtenus ainsi que les valeurs détaillées des NPP, pour le dénombrement de *S.typhimurium*.

Quatre codes différents sont obtenus pour chaque temps, car, un essai est réalisé à double et le même essai est reproduit dans le temps. La moyenne des NPP est réalisée et c'est avec le logarithme de cette moyenne que la réduction est calculée. Des écarts plus ou moins importants distinguent les NPP obtenus pour chaque essai. En effet, lors du premier test réalisé, deux NPP différents apparaissent (15 et 110 NPP/g). Les mêmes conditions sont répétées dans le temps et cette fois, se sont deux codes, identiques entre eux mais différents du premier essai, qui apparaissent (2.3 NPP/g). Malgré cette distinction, la réduction obtenue est toujours supérieure à la limite fixée par les 6D et la sécurité microbiologique du produit est assurée.

Le niveau acceptable assurant la sécurité du procédé de pasteurisation a été défini comme supérieur ou égal à six réductions décimales des formes végétatives présentes ( $\geq 6D$ ). Il faut préciser qu'en général une réduction de  $5D^{[10]}$  est recherchée, le niveau choisi garantit donc la sécurité du ketchup.

Sur base de cette limite admise, deux résultats peuvent être mis en évidence. D'une part, un traitement de  $50^{\circ}C$  durant trois minutes suffit pour maintenir une réduction de 8D et donc, la sécurité du produit vis-à-vis des germes pathogènes. D'autre part, il est nécessaire d'appliquer un traitement de  $55^{\circ}C$  durant trois minutes, pour maîtriser les germes d'altération. Ces résultats confirment ceux obtenus pour l'influence du ketchup sur la vitalité des souches, qui montraient également une résistance des germes d'altération plus importante vis-à-vis de la matrice qu'est le ketchup. En effet, la réduction obtenue pour *L.plantarum* avec ces conditions est supérieure à 6.2D alors qu'elle est de 6.0D pour *Z.baillii*. Ces deux dernières réductions sont à la frontière du niveau acceptable déterminé, en se basant sur une durée de traitement de trois minutes. En revanche, si les 400 secondes sont considérées, les trois réductions citées ci-dessus évoluent en 10.0D pour les germes pathogènes, respectivement supérieure à 7.7D et 6.6D pour les germes d'altération. Cependant, il faut s'attendre à ce que le scale-up en entreprise, fournisse des résultats différents de ceux obtenus en laboratoire.

En admettant une température critique de pasteurisation de  $66^{\circ}C$ , fonction du premier tube de l'échangeur dont la température est fixe, la sécurité alimentaire est assurément garantie (*Salmonella spp.*, non décelable dans 125g avec un  $N_0 = \sim 3.0E+09$  ufc/g) et un gain de  $19^{\circ}C$ , par rapport à la température actuelle de pasteurisation, est réalisé. Si une valeur  $z$  est estimée à  $5^{\circ}C$ , sachant que cette valeur varie selon les formes végétatives,<sup>[11]</sup> il est possible de dire qu'une pasteurisation de trois minutes à  $85^{\circ}C$  possède un effet environ 6300 fois plus fort qu'une pasteurisation de trois minutes à  $66^{\circ}C$ . L'économie d'énergie éventuelle n'est donc pas négligeable. Le ketchup ne possédant pas de qualités nutritionnelles, à proprement parlé et se composant essentiellement de sucre, il est illusoire d'aborder le sujet de la dénaturation des protéines, qui ne serait en rien influencé, au vu des températures peut excessives.



#### **5.4 INFLUENCE DU KETCHUP SUR L'EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE, DANS LES CONDITIONS DU DÉNOMBREMENT DE LA MÉTHODE DU NPP**

La méthode du NPP étant basée sur l'ensemencement de plusieurs répliquats de bouillons nutritifs stériles, il a été intéressant d'observer le comportement d'un bouillon vis-à-vis d'une certaine quantité de ketchup. Dans ce cas, c'est le comportement du bouillon utilisé pour *S.typhimurium* qui a été étudié car les deux autres souches ont montré une plus grande résistance face à la matrice qu'est le ketchup. L'eau peptonée tamponnée est utilisée comme revitalisant lors du pré-enrichissement des *salmonelles*. Son système de tampon phosphate permet d'éviter toutes modifications de pH qui nuirait aux bactéries.

Le pH mesuré du BPW seul est de 6.96 à 23.5°C. Une fois l'échantillon de ketchup ajouté, conformément aux conditions expérimentales du dénombrement du NPP, le pH moyen de la suspension contenant le ketchup chauffé à 50°C diminue à 6.32 alors que celle contenant le ketchup à température ambiante est de 6.35. La diminution du pH n'est pas excessive et ne peut donc pas nuire à la bactérie. Il est à constater que la température du ketchup n'influence pas de manière significatives le pH de la solution, cette remarque prévaut aussi pour les suspensions contenant l'eau physiologique.

En ce qui concerne les diminutions de pH des suspensions réalisées avec de l'eau physiologique, il en est tout autrement. En effet, le VL seul, affiche un pH de 7.00 à 23.5°C mais celui-ci, une fois mélangé au ketchup, diminue en moyenne à 4.05 pour la dilution -1 et à 4.66 pour la dilution -2. L'écart, séparant ces valeurs, peut jouer un rôle dans le sens qu'un pH de 4.05 peut avoir un effet négatif sur les bactéries, déjà « stressées » par le traitement thermique. Ceci est moins significatif pour la dilution -2. Le dénombrement, selon la méthode du NPP, étant basé sur ces mêmes dilutions, il est envisageable d'obtenir un code n'appartenant pas à la catégorie ayant la plus forte probabilité d'occurrence. En effet, il serait possible que la solution la plus diluée présente un nombre de résultats positifs supérieurs à la dilution précédente, plus concentrée. Ceci n'a pas été le cas durant ce travail mais cette éventualité doit être connue et envisagée.

## 5.5 DÉTERMINATION DE LA VISCOSITÉ DU KETCHUP EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE

Le ketchup est un produit thixotrope, c'est à dire que sa viscosité diminue lorsqu'il est soumis à une contrainte, et qu'il récupère sa structure après un moment laissé au repos. Il aurait été désavantageux pour l'entreprise que la température critique de pasteurisation, déterminée dans le cadre de ce travail de diplôme, modifie de manière importante la viscosité du produit. En effet, ceci aurait pu engendrer des difficultés au niveau des débits de matière dans les différentes conduites, utilisées pour le transport du produit.

Il s'est donc avéré judicieux de s'intéresser au changement éventuel de la viscosité du produit. Des résultats fiables ont pu être recueillis du fait de la technologie de l'appareil utilisé. Ce viscosimètre de Couette comporte un cylindre rempli du liquide à étudier, dans lequel est immergé un cylindre plein, entraîné de l'extérieur par un mécanisme permettant la mesure du couple. Ce viscosimètre donne donc une mesure directe de la viscosité dynamique. Il est possible de commander l'appareil afin que la température du produit augmente selon des paliers fixés. Pour chaque palier de température, l'appareil donne la valeur de viscosité correspondante en fonction d'un taux de cisaillement imposé. Dès lors, différents taux de cisaillement ont été choisis afin de mettre en évidence une tendance, qui montre que les différences de viscosité entre deux températures distinctes s'amointrissent avec l'augmentation du taux de cisaillement.<sup>[1]</sup>

Ainsi, une pasteurisation à 60°C confère pratiquement la même viscosité qu'un traitement à 85°C, pour le taux de cisaillement maximal testé (500 [1/s]). Il faut préciser que le cisaillement produit par un échangeur à surface raclée est bien plus important que la valeur choisie ce qui ne fait que minimiser l'écart des viscosités. La température critique de pasteurisation ne présente donc pas de problème en ce qui concerne la texture du produit.

## **5.6 ANALYSE EXHAUSTIVE DES DANGERS POUR LA PRODUCTION DU *TOMATO KETCHUP HOT* ET DE LA SAUCE *FRENCH DRESSING AUX HERBES*, SELON LA NORME ISO 22000:2005**

### **5.6.1 GÉNÉRALITÉS**

L'une des exigences d'ISO 22000 consiste à identifier, de manière raisonnable, tous les dangers liés à la sécurité des denrées alimentaires pouvant survenir aux différentes étapes de la fabrication du produit. Cette identification doit relever d'une certaine systématique, pour se faire l'arbre décisionnel recommandé par l'ICD<sup>[4]</sup> a été utilisé, celui-ci se trouve à l'annexe [XIII]. La réflexion est la suivante, tout ce qui ne mène pas à un danger selon l'arborescence de questions, n'est pas répertorié dans les tableaux figurants sous 4.6 et 4.7. La structure de ces tableaux est identique à celle vu et proposé par le cours de Food Safety.<sup>[8]</sup> L'une des innovations majeures de l'ISO 22000 et la mise en place de programmes prérequis opérationnels (oPRP). Afin de savoir attribuer un CCP plutôt qu'un oPRP et inversement, l'arbre décisionnel ISO-22000 ProCert<sup>[5]</sup> a été utilisé, celui-ci se trouve à l'annexe [XIV].

### **5.6.2 *TOMATO KETCHUP HOT***

La flore initiale du ketchup est directement dépendante des matières premières et provient essentiellement des épices. La fabrication du ketchup, tel que réalisée par l'entreprise et visible aux annexes [XV] et [XVI], consiste à mixer tous les ingrédients puis à pasteuriser le mélange, avant de remplir les bouteilles à chaud. Ce procédé élimine l'éventuelle contamination par des organismes d'altération provenant des matières premières ou du processus lui-même. Le conditionnement à chaud et le fait que celui-ci se déroule sous flux laminaire, évite toute contamination durant le remplissage. Le ketchup est donc un produit relativement simple à obtenir et son acidité ( $1.4 \text{ g/dl} \cong 80\%$  d'acide acétique non dissocié) ainsi que son faible pH ( $3.6 \pm 0.2$ )<sup>[2]</sup>, font de cette sauce un milieu défavorable au développement des bactéries pathogènes (*salmonelles*). En effet, pour assurer la sécurité et prévenir leurs croissances, un minimum de 0.2% d'acide acétique non dissocié et un pH inférieur à 4.5 sont indiqués.<sup>[18]</sup> Quelques levures et *Lactobacillus*, comme *Z.baillii* et *L.plantarum* supportent cependant des teneurs en acide acétique plus élevées. Celles-ci peuvent s'élever jusqu'à 3% d'acide acétique non dissocié, ce qui est toujours bien inférieur au 80% contenu dans le ketchup.

Les conservateurs comme l'acide sorbique ou benzoïque peuvent être utilisés pour prolonger la date de péremption du produit. L'addition de 0.05 % de l'un de ces acides dans une sauce Mexicaine à base de tomate, préviendrait la croissance des levures sur une période de dix jours<sup>[9]</sup>. En considérant que les germes d'altération les plus fréquents dans le ketchup sont les levures et les *Lactobacillus spp.*, l'acide benzoïque sera préféré car il est actif aussi bien contre les levures que contre les *Lactobacillus spp.*<sup>[18]</sup>

Le concentré de tomate utilisé, est fourni pasteurisé et conditionné dans des poches aseptiques. Ce traitement garantit l'absence de germes végétatifs d'altération et de germes végétatifs pathogènes. En ce qui concerne les épices, le poivre de Cayenne et le poivre blanc subissent un traitement en amont, avant d'être livrés. Le processus de séchage réduit le nombre de végétatives présentes et la flore restante se compose alors essentiellement de moisissures et de spores bactériennes (*B.cereus* et *C. perfringens*). La germination de ces dernières dans le ketchup sera maîtrisée par l'acidité du produit. Il faut rappeler qu'une importante prolifération ( $10^6$ - $10^9$  ufc/g)<sup>[7]</sup> est nécessaire pour provoquer une intoxication. Comme il est rare de trouver de telles concentrations dans les épices<sup>[19]</sup>, il est presque impossible qu'une telle charge microbienne se retrouve dans le ketchup au vu du pourcentage d'épices (0.4%)<sup>[2]</sup> entrant dans sa composition. Le tableau de l'annexe [XVII] met en évidence la gamme de distribution de *B.cereus* dans divers épices.

Lors de la fabrication du ketchup, il est donc essentiel de garantir le barème de pasteurisation validé, afin d'assurer la sécurité microbiologique du produit vis-à-vis des germes végétatifs pathogènes. La pasteurisation est définie comme un CPP dans l'analyse des dangers. Le *controlling* et le *monitoring*, qui sont deux conditions fondamentales à l'obtention d'un CCP, sont remplis. Le *controlling* étant le barème de pasteurisation et le *monitoring* étant la température du pasteurisateur, qui est enregistrée en temps réel sur un ordinateur. La procédure de surveillance est assurée par un ordinateur, qui enregistre les données du barème de pasteurisation.

En ce qui concerne le danger que représentent les germes pathogènes sporulants, une mesure de maîtrise a été ajoutée. A l'étape du stockage (n°17) décrite sous 4.6, la mesure de maîtrise est l'acidification. La procédure de surveillance consiste à vérifier que le pH est bien inférieur à 4, un tel pH empêchant la germination des spores. Selon l'arbre de décision d'ISO 22000 ProCert, concernant les CCP et les oPRP, cette étape est un oPRP, dans le sens où la mesure du pH est une mesure ponctuelle et qu'il n'y a pas de sonde de pH directement dans le tank. L'analyse est effectuée une fois par heure et non *on line*. Il faut préciser que le vinaigre utilisé est un vinaigre fabriqué par la maison Reitzel, par conséquent, une surveillance en amont est effectuée sur ce produit. Étant donné que l'acidité du ketchup est principalement apportée par le vinaigre et que sa teneur en alcool reste constante, il est fort improbable que le pH du mélange varie d'une production à l'autre.

La réception du vinaigre et de la saumure anciennement un CCP a été modifiée en un oPRP. Comme cité plus haut, ces produits sont soumis à leurs propres analyses des dangers et une contamination par des corps étrangers non métallique est peu probable, au vu de l'expérience des cinq dernières années. De plus, le *monitoring* mis en place (vérification mensuel des filtres) ne correspond pas aux attentes d'un CCP.

L'étape du détecteur de métaux est restée un CCP, dans la mesure où le *controlling* est le détecteur de métaux lui-même et le *monitoring*, le défilé continu des bouteilles sous le détecteur, durant le conditionnement. La procédure de surveillance mis en place pour ce CPP et le passage d'une carte témoin (une fois par heure), indiquant le bon fonctionnement de l'appareil, ainsi que le journal des rebuts.

Les résidus éventuels de pesticides à la réception (oPRP) du concentré de tomate et des épices sont maîtrisés grâce aux bonnes pratiques agricoles du fournisseur et surveillés grâce à un plan d'analyses externes effectué annuellement. La fréquence de ces analyses est crédible, car l'expérience des cinq dernières années ne met aucun problème majeur en évidence, qui pousserait à augmenter le nombre d'analyses externes réalisés. La réception du concentré de tomate et des épices est également considérée comme un oPRP, vis-à-vis de la présence de mycotoxines. Tout comme pour les résidus de pesticides, Reitzel dispose de spécifications pour chaque fournisseur et ce danger est géré par les bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène, au moment de la production primaire. La fréquence des analyses externes est la même que pour les résidus de pesticides et au vu des résultats des dernières années, il n'y a pas de raison de renforcer les contrôles.

Le danger lié aux allergènes, transmis via une contamination croisée, est maîtrisé grâce au plan de fabrication, qui définit un ordre de passage de telle façon que les substances allergènes ne peuvent se retrouver dans le mauvais produit. Si l'ordre de passage ne peut être suivi, un NEP est automatiquement réalisé et validé. Toutes les étapes, dont le danger est lié aux allergènes, sont considérées comme des oPRP.

Enfin, une contamination du produit fini, lors du remplissage (oPRP) des bouteilles est écartée du fait du conditionnement à chaud sous flux laminaire. La procédure de surveillance, pour le flux laminaire, réside en une analyse mensuelle des germes dans l'air du flux.

La distribution du ketchup n'est pas une étape à risque étant donné que ce produit se conserve à température ambiante et par conséquent aucune chaîne du froid ne doit être respectée. Aucun danger susceptible de survenir au niveau de la distribution n'a été mis en évidence.

### 5.6.3 FRENCH DRESSING AUX HERBES

La charge microbienne majeure, de cette sauce aux herbes, provient des divers ingrédients la composant. Plus précisément des épices (poivre de Cayenne et poivre blanc), des épices déshydratées (persil et herbes de Provence) et du jaune d'œufs. La fabrication de la *french dressing aux herbes*, dont le diagramme de flux se trouve aux annexes [XVI] et [XVIII], consiste à homogénéiser en continu, des quantités pompées définies de chaque phase que sont l'œuf, l'huile et l'eau. La phase œufs comprenant un mélange pasteurisé de jaune d'œuf liquide additionné d'environ 11% de sel, la phase huile étant l'huile raffinée et les épaississants, et enfin la phase aqueuse consistant en du vinaigre, de la moutarde, des herbes et des condiments. Contrairement au ketchup, le mélange en lui-même n'est pas pasteurisé mais chaque phase, ajoutée pour l'homogénéisation, subit le traitement adéquat, afin que le mélange puisse être conditionné. Ainsi, les jaunes d'œufs salés sont reçus pasteurisés, ils ne nécessitent donc pas de traitement supplémentaire. Il en est de même pour la moutarde et le vinaigre qui sont fabriqués par la maison Hugo Reitzel SA et qui ne nécessitent donc pas d'opérations additionnelles. Les herbes déshydratées sont stérilisées (100°C/15minutes) avant de rejoindre, les condiments, les produits frais, la saumure et les auxiliaires technologiques, qui seront traités par une pasteurisation (85°C/400secondes). Le mélange obtenu est ensuite conditionné. L'impact du procédé de fabrication, sur la charge microbienne du produit est négligeable. Le conditionnement se déroule sous flux laminaire et évite toutes contaminations durant le remplissage.

La sauce *french dressing aux herbes* possède une acidité plus faible que le ketchup (0.7 g/dl  $\cong$  87% d'acide acétique non dissocié) et un pH légèrement plus haut ( $4.0 \pm 0.2$ ) <sup>[3]</sup>, ce qui n'empêche pas cette sauce d'être un milieu défavorable au développement des bactéries pathogènes. Tout comme pour le ketchup, la sécurité et la prévention, de la croissance des pathogènes, sont assurées par un minimum de 0.2% d'acide acétique non dissocié et un pH inférieur à 4.5. La même observation qu'au point 5.6.2, peut être faite, concernant les germes d'altération. Il est également possible d'utiliser des conservateurs tels l'acide sorbique et l'acide benzoïque, pour limiter de manière efficace l'altération. Par contre, pour la sauce dressing, c'est l'acide sorbique qui sera préféré car celui-ci se dissout dans la phase huile en plus faible proportion que l'acide benzoïque. De ce fait, son efficacité en tant que conservateur est plus importante. <sup>[18]</sup>

Les jaunes d'œufs salés utilisés, sont fournis pasteurisés et conditionnés dans des seaux de 10 kg. Ce traitement garantit l'absence de germes végétatifs d'altération et de germes végétatifs pathogènes. Malgré cela, un test rapide de *salmonelles*, sur 24 heures, est effectué sur chaque arrivage de lot de jaune d'œufs. Le lot n'est pas libéré avant d'avoir obtenu les résultats négatifs du test. Les prélèvements d'échantillon effectués sont trop faibles pour être assez représentatifs, de ce fait, cette étape de la réception du jaune d'œuf n'est plus considérée comme un CCP mais comme un oPRP.

Comme expliqué plus haut, le procédé de fabrication intègre cette matière première directement au niveau de l'homogénéisation et il n'y a pas d'étape en aval, si ce n'est le produit lui-même, qui permette d'éliminer les éventuelles *salmonelles* présentes.

En ce qui concerne les épices, les mêmes considérations que celles établies sous le point 5.6.2 peuvent être reprises ici. En effet, les dangers liés à la réception des épices et des épices déshydratées ainsi que leurs mesures de maîtrise, sont identiques à ceux décrits pour la réception des épices dans la production de ketchup.

La fabrication de la sauce *french dressing aux herbes*, impose également une pasteurisation afin de garantir la sécurité microbiologique de la phase aqueuse vis-à-vis des germes végétatifs d'altération et pathogènes. Cette étape est considérée comme un CCP pour les mêmes raisons que citées sous 5.6.2. Le *controlling* et le *monitoring* sont identiques à ceux mis en place pour le ketchup, car l'échangeur à surface raclée, utilisé sur la ligne de production des sauces est similaire au pasteurisateur employé pour le traitement du ketchup.

En ce qui concerne le danger que représentent les germes pathogènes sporulants, une mesure de maîtrise a été ajoutée. A l'étape du stockage (n°22 = oPRP) décrite sous 4.7, la mesure de maîtrise est, comme dans le cas du ketchup, l'acidification. La procédure de surveillance est identique, ainsi les remarques faites sous 5.6.2 sont également valables pour cette étape du procédé de fabrication des sauces. Les explications concernant le détecteur de métaux ainsi que la modification de l'étape de réception du vinaigre et de la saumure, en oPRP, sont identiques à celle émises sous 5.6.2.

Les résidus éventuels de pesticides ainsi que la présence de mycotoxine, à la réception (oPRP) des épices et de l'ail frais, sont maîtrisés de la même manière que les résidus de pesticides et les mycotoxines concernant les matières premières du ketchup. Les commentaires effectués sous 5.6.2 sont également applicables ici.

Le danger lié à la présence d'allergènes, via une contamination croisée, pour les sauces est également contrôlé par le bon suivi du plan de fabrication, comme exposé au sous chapitre précédent.

Enfin, une contamination du produit fini, lors du remplissage (oPRP) des bouteilles est écartée du fait du conditionnement sous flux laminaire. La procédure de surveillance pour le flux laminaire réside en une analyse mensuelle des germes dans l'air du flux.

La distribution des sauces n'est pas une étape à risque étant donné que ce produit se conserve à température ambiante et par conséquent aucune chaîne du froid ne doit être respectée. Aucun danger susceptible de survenir au niveau de la distribution n'a été mis en évidence.



## 6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de diplôme a permis de déterminer la température de pasteurisation critique pour la fabrication de ketchup. Un barème minimal de 50°C durant 3 minutes permet d'assurer une réduction suffisante vis-à-vis des germes pathogènes alors qu'il faut un traitement de 55°C durant 3 minutes pour garantir une réduction acceptable des germes d'altération.

En considérant une température de pasteurisation de 66°C, fixée par le premier tube de l'échangeur à surface raclée, il est possible d'estimer que la pasteurisation à 85°C apporte un traitement thermique près de 6300 fois plus fort. Une éventuelle réduction de température entraînerait des économies d'énergie non négligeables.

Il serait idéal de réaliser un essai de pasteurisation, sur l'échangeur à surface raclée utilisé par Reitzel ou du moins à l'échelle pilote, afin de se rapprocher au mieux des conditions effectives de l'entreprise et de pouvoir confirmer les résultats obtenus en laboratoire. Afin de mener à bien ce scale-up directement dans les conditions de l'entreprise, il serait envisageable de tester l'influence de la pasteurisation avec un germe d'altération uniquement. En effet, la levure *Z.baillii* a montré une résistance plus importante que les autres souches testées, vis-à-vis des conditions de pasteurisation. Cet état de fait simplifie le test à grande échelle qui ne pourrait se faire avec un germe pathogène au vu des risques trop importants encourus par cette manipulation.

Le risque de germination des spores dans le ketchup, peut être écarté au vu des résultats présentés par les suivis de leurs évolutions. L'acidification du ketchup, à un pH inférieur à 4, garantit la maîtrise de la germination des spores.

L'outil de travail que représente l'HACCP, permet aux entreprises alimentaires de prévenir, d'éliminer ou de réduire les risques à des niveaux acceptables. C'est en utilisant cette méthode qu'il a été possible de mettre en évidence les aspects suivants.

Le point commun du ketchup et d'une sauce dressing est une teneur en acide acétique non dissocié supérieure à 80% et un pH inférieur à 4. Ces deux caractéristiques sont essentielles pour prévenir la croissance de pathogènes.

La stabilité du ketchup est assurée par un faible pH, par une  $a_w$  réduite (0.93) due au contenu élevé en sucres et en acide acétique, et par une pasteurisation, suivi d'un conditionnement à chaud. Ceci élimine les contaminations éventuelles par des organismes d'altération.

Les sauces dressing ont un processus de fabrication différent du ketchup, dans le sens où la sécurité du produit est assurée par un traitement spécifique de chaque ingrédient, lesquels sont ensuite mélangés et conditionnés. De ce fait, l'absence d'infections pathogènes, venant des sauces dressing, peut être assurée par une bonne conception du produit.



En se procurant tous les ingrédients à risque, auprès de fournisseurs sérieux, qui contrôlent le danger des pathogènes sur la base d'un HACCP validé, l'entreprise Hugo Reitzel SA maîtrise les risques attribués à cette sauce.

Les dangers, mis en évidence pour ces deux produits, sont relativement similaires et proviennent essentiellement des épices utilisées. Une mesure de maîtrise, représentée par l'acidification, est donc à ajouter pour chacun des produits, aux étapes précédant le remplissage. Reitzel ne doit donc pas recourir à des modifications majeures dans sa méthode de production de ketchup et des sauces dressing.

Il serait intéressant de travailler sur la pasteurisation de la phase aqueuse des sauces dressing afin de déterminer la température critique de pasteurisation pour cette production. Il faudrait envisager de tester la diminution de la température du remplissage à chaud afin de trouver la température limite pour le remplissage.

## **7 REMERCIEMENTS**

Un grand merci à toutes les personnes qui ont collaboré, directement et indirectement, à la bonne réalisation de ce travail de diplôme :

- A M. Sébastien Decosterd, pour sa gentillesse, sa patience et son soutien qui m'ont accompagné tout au long de mon travail.
- Au Dr. Rudolf Schmitt, pour ses connaissances, sa flexibilité et ses conseils précieux dans les moments de doutes.
- Au Dr. Esther Schmitt, pour la confiance accordée et ses encouragements durant les travaux en laboratoire.
- A M. Bruno Lehner, pour son immense patience, ses conseils pratiques et son humour. A Chantal, Martine, Yann et Lara, pour l'ambiance chaleureuse de travail et leurs aides multiples.
- A M. Guiseppe Gresia, pour les joyeux moments passés ensemble et son soutien agréable en toutes occasions.
- A M. Vivian Mérinat, M<sup>lle</sup> Christel Kaser et M<sup>lle</sup> Patricia Garnier, pour leurs présences, leurs réconforts et le temps consacré à mes relectures.

## 8 BIBLIOGRAPHIE

### Ouvrage et article :

1. BIMBENET J.J., DUQUENOY A., TRYSTAM G., Génie des procédés alimentaires, des bases aux applications, 2<sup>nd</sup> édition, modèles rhéologiques, chapitre 1.1.3, Dunod, Paris, (2007), p10
2. DECOSTERD S., Fiche de produit *TOMATO KETCHUP « HOT »*, Reitzel Suisse, (2009)
3. DECOSTERD S., Fiche de produit *FRENCH DRESSING AUX HERBES*, Reitzel Suisse, (2009)
4. DR. BLANC D., Guide HACCP, F33.1, version 3, ProCert, Lausanne (2003)
5. DR. BLANC D., ISO 22000, HACCP et sécurité des aliments, Recommandations, outils, FAQ et retour de terrain, ProCert, chapitre 3.10.3, AFNOR, France, (2006)
6. DR. SCHMITT E., Microbiologie générale, Microscopie quantitative, support écrit des travaux pratiques de microbiologie, Haute école valaisanne, Sion (2005), p1 à p3
7. DR. SCHMITT R., Cours de microbiologie alimentaire, Risques microbiologiques par des organismes pathogènes, Haute école valaisanne, Sion (2006)
8. DR. SCHMITT R., Explication des principes du système HACCP basée sur ALINORM CAC/RCP, 1-1969, Rev.4, Haute école valaisanne, Sion (2003)
9. FLORES L.M., *et al.*, Effect of potassium sorbate and other treatments on the microbial content and keeping quality of a restaurant type Mexican hot sauce, J. Food Prot., (1988), 51, 4-7
10. JEANTET R., *et al.*, Science des aliments, volume 1., Stabilisation biologique et physico-chimique, Pasteurisation, chapitre 6.4.1.1, TEC&DOC, Lavoisier, Paris, (2006), p 288
11. JEANTET R., *et al.*, Science des aliments, volume 1., Stabilisation biologique et physico-chimique, Destruction des micro-organismes à température constante, chapitre 6.1, TEC&DOC, Lavoisier, Paris, (2006), p 279 à p285
12. LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Fermentations alimentaires, chapitre 4 Saint-Martin, Montréal, (2004), p181 à 184
13. LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Conservation par la chaleur, chapitre 6, Saint-Martin, Montréal, (2004), p384
14. LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p491 à 495

15. LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p495 à 499
16. LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Analyse microbiologique des aliments, chapitre 8, Saint-Martin, Montréal, (2004), p608 et p609
17. LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Zygosaccharomyces, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p665
18. LUND B.M, BAIRD-PARKER T.C, GOULD G.W, The Microbiological Safety and Quality of Food, Volume 1, chapitre 30, Mayonnaise, Dressings, Mustard, Mayonnaise-Based Salads, and Acid Sauces, Aspen Publishers, Inc., Maryland (2000), p 807 – p 831
19. LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Effect of primary processing, packaging, and storage on the microflora of spices and herbs, chapitre 33.7, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p902 et p903
20. Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA), cinquième édition, 56 Microbiologie, Etudes quantitatives des micro-organismes, chapitre 5.2.2.2, Office fédérale de la santé publique, Berne, (1989), p24 et p25
21. Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA), cinquième édition, 56 Microbiologie Spores aérobies, chapitre 7.02, Office fédérale de la santé publique, Berne, (1989), p1 et p2
22. Manuel suisse des denrées alimentaires (MSDA), Microbiologie, points C, D, E10 et E20, chapitre 56, Office fédérale de la santé publique, Berne, (2004)
23. MILANI F., Production de spores de *B.atropheus* et détermination de leur résistance à la chaleur, méthode 2.1.2.2, travail de diplôme, HEVs, Sion, (2005), p 15
24. The International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF 5), Microorganisms in foods 5, Microbiological specifications of food pathogens, Blackie Academic & Professional, London (1996), p20

Sites internet :

- A. <http://www.reitzel.ch>
- B. [http://www.reitzel.ch/html/profil\\_chiffrescles\\_fr.html](http://www.reitzel.ch/html/profil_chiffrescles_fr.html)
- C. [http://www.heinz.be/belgium/b\\_home.php?n=8](http://www.heinz.be/belgium/b_home.php?n=8)

---

Documentation pour l'analyse des dangers du *Tomato ketchup* et de la sauce *french dressing*  
aux herbes :

- **Littérature 1 : Vinaigre**

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Microorganisms Present in Vinegar, chapitre 30.2.2, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p809 à 810

- **Littérature 1\* : Acidifiant**

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Microorganisms Present in Lactic Acid and Other Acids, chapitre 30.2.2, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p810

- **Littérature 2 : Saumure**

JEANTET R., ET AL., Science des aliments, Stabilisation biologique et physico-chimique volume I, Chlorure de sodium, chapitre 4.1.2.1, TEC&DOC, Lavoisier, Paris, (2006), p 254 et 255

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Microorganisms Present in Sugar, Salt, and Preservatives, chapitre 30.2.2, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p810

- **Littérature 3 : *Lactobacillus spp* dans la tomate et le ketchup**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Fermentations alimentaires, chapitre 4 Saint-Martin, Montréal, (2004), p181 à 184

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, *Lactobacillus*, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p650

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Spoilage Associations and Pathogen Hazards, chapitre 30.3.4, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p821

The International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF 6), Microorganisms in Foods 6, Microbial ecology of food commodities, 2<sup>nd</sup> Edition, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York (2005), p448 à p449

- **Littérature 3\* : *Lactobacillus* spp. dans la moutarde**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Fermentations alimentaires, chapitre 4 Saint-Martin, Montréal, (2004), p181 à 184

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, *Lactobacillus*, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p650

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Spoilage Associations and Pathogen Hazards, chapitre 30.2.4, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p811, p812

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Spoilage Associations and Pathogen Hazards, chapitre 30.4.4, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p823

- **Littérature 4 : *Salmonella* spp. : généralités - dans les épices**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Origine des microorganismes contaminants, chapitre 5, Saint-Martin, Montréal, (2004), p283 à 288

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Détérioration des aliments, chapitre 5, Saint-Martin, Montréal, (2004), p358

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p495 à 499

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, *Salmonella*, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p654

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Microorganisms Present in Herbs and Spices, chapitre 30.2.2, Aspen publishers, Maryland (2000), p810

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Pathogenic Bacteria, chapitre 33.6.3 et Microbial spoilage of spices and foods by microorganisms from spices, chapitre 33.9, Aspen publishers, Maryland (2000), p902 et p905

PRESCOTT L., HARLEY J.P., KLEIN D.A., Microbiologie. 2e éd., La microbiologie alimentaire, chapitre 41, De Boeck Université. Bruxelles, (2003), p 964 et 965

- **Littérature 4 \* : *Salmonella spp.* : généralités - dans la tomate**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Origine des microorganismes contaminants, chapitre 5, Saint-Martin, Montréal, (2004), p283 à 288

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p495 à 499

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, *Salmonella*, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p654

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Initial Microflora, chapitre 30.3.2, Aspen publishers, Maryland (2000), p821

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Spoilage Associations and Pathogen Hazards, chapitre 30.3.4, Aspen publishers, Maryland (2000), p821

The International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF 6), Microorganisms in Foods 6, Microbial ecology of food commodities, 2<sup>nd</sup> Edition, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York (2005), p449 et p450

- **Littérature 4\*\* : *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* : contamination par les rongeurs/insectes**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Origine des microorganismes contaminants, chapitre 5, Saint-Martin, Montréal, (2004), p289 à 293

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p495 à 499

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, *Salmonella*, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p654

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p512 à 515

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, *Listeria*, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p652

- **Littérature 4\*\*\* : *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* :  
contamination par les manipulations humaines**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Origine des microorganismes contaminants, chapitre 5, Saint-Martin, Montréal, (2004), p289 à 293

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p483 à 487

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, *Staphylococcus*, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p655

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p495 à 499

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, *Salmonella*, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p654

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p502, p504, p521

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, *Escherichia*, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p649

- **Littérature 5 : *Bacillus* et *Clostridium* : généralités - dans les épices**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Caractères morphologiques, chapitre 1 et Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p32 à 34 et p491 à 495

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Saprophytic Bacteria, chapitre 33.6.2, Aspen publishers, Maryland (2000), p899 à p902

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Pathogenic Bacteria, chapitre 33.6.3, Aspen publishers, Maryland (2000), p902

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Effect of primary processing, packaging, and storage on the microflora of spices and herbs, chapitre 33.7, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p902 et p903



PRESCOTT L., HARLEY J.P., KLEIN D.A., Microbiologie. 2e éd., La microbiologie alimentaire, chapitre 41, De Boeck Université. Bruxelles, (2003), p 964 et 965

<http://www.bacteriologie.net/generale/spore.html>

- **Littérature 5\* : *Bacillus* et *Clostridium* dans la moutarde**

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Initial Microflora, chapitre 30.4.2 et Spoilage Associations and Pathogen Hazards, chapitre 30.4.4, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p822 et p823

<http://www.bacteriologie.net/generale/spore.html>

- **Littérature 5\*\* : *Bacillus* et *Clostridium* : généralités - dans la tomate**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Conservation par la chaleur, chapitre 6, Saint-Martin, Montréal, (2004), p384

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Caractères morphologiques, chapitre 1 et Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p32 à 34 et p491 à 495

The International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF 6), Microorganisms in Foods 6, Microbial ecology of food commodities, 2<sup>nd</sup> Edition, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York (2005), p269 à 270

<http://www.bacteriologie.net/generale/spore.html>

- **Littérature 6 : *Zygosaccharomyces baillii* : généralités - dans les sauces dressings**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Déterioration des aliments, chapitre 5, Saint-Martin, Montréal, (2004), p350

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, *Zygosaccharomyces*, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p665

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Microorganisms Present in Sugar, Salt, and Preservatives, chapitre 30.2.2, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p810

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Yeasts, chapitre 30.2.4, Aspen publishers, Maryland (2000), p811

- **Littérature 6\* : *Zygosaccharomyces baillii* : généralités - dans la tomate et le ketchup**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Déterioration des aliments, chapitre 5, Saint-Martin, Montréal, (2004), p350

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, *Zygosaccharomyces*, Appendice, Saint-Martin, Montréal, (2004), p665

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Microorganisms Present in Sugar, Salt, and Preservatives, chapitre 30.2.2, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p810

The International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF 6), Microorganisms in Foods 6, Microbial ecology of food commodities, 2<sup>nd</sup> Edition, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York (2005), p446 à 448

- **Littérature 7 : Coliformes**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Analyse microbiologique des aliments, chapitre 8, Saint-Martin, Montréal, (2004), p619 et 620

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Saprophytic Bacteria, chapitre 33.6.2, Aspen publishers, Maryland (2000), p899 à 902

PRESCOTT L., HARLEY J.P., KLEIN D.A., Microbiologie. 2<sup>e</sup> éd., La microbiologie alimentaire, chapitre 41, De Boeck Université. Bruxelles, (2003), p964 et 965

- **Littérature 8 : *Bacillus* et *Clostridium* dans l'amidon**

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Microorganisms Present in Starch, chapitre 30.2.2, Aspen publishers, Maryland (2000), p810

- **Littérature 9 : Entérobactérie**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Toxi-infections alimentaires dues à des bactéries, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p521

- **Littérature 10 : Huile**

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Microorganisms Present in Oil, chapitre 30.2.2, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p809

- **Source internet 10\* : Huile frelatée**

<http://www.dhnet.be/infos/faits-divers/article/206502/40000-tonnes-d-huile-de-tournesol-contaminees-volontairement.html>

- **Littérature 11 : Mycotoxines : généralités et dans les épices**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Intoxications alimentaires dues à des moisissures, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p522 à 529

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Fungal Contamination and Mycotoxins, chapitre 33.6.4, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p902

Règlement (CE) N 466/2001 de la commission du 8 mars 2001 (état le 29.11.2005) portant sur la fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, 012.001, (14) p4 et Section 2, Annexe 1

- **Littérature 11\* : Moisissure de la tomate**

The International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF 6), Microorganisms in Foods 6, Microbial ecology of food commodities, 2<sup>nd</sup> Edition, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York (2005), p260 et p261

- **Littérature 11\*\* : Mycotoxine dans l'ail**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Intoxications alimentaires dues à des moisissures, chapitre 7, Saint-Martin, Montréal, (2004), p522 à 529

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Fungal Contamination and Mycotoxins, chapitre 33.6.4, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p902

Règlement (CE) N 466/2001 de la commission du 8 mars 2001 (état le 29.11.2005) portant sur la fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, 012.001, (14) p4 et Section 2, Annexe 1

SEEFELDER W., GOSSMANN M., HUMPF H.U., Analysis of Fumonisin B1 in Fusarium proliferatum-Infected Asparagus Spears and Garlic Bulbs from Germany by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry, J. Agric. Food Chem., (2002), 50 (10), p2778–2781

- **Littérature 12 : *Salmonella* spp. dans les jaunes d'œufs**

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Microorganisms Present in Egg Yolk, chapitre 30.2.2, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p809

LUND B.M., BAIRD-PARKER T.C., GOULD G.W., The microbiological safety and quality of food Volume I, Absence of Infectious Pathogens, chapitre 30.2.4, Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland (2000), p814

MARTH E.H., Growth and survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* species and *Staphylococcus aureus* in the presence of sodium chloride : a review, Dairy, food and environmental sanitation, USA, (1993), v. 13(1), p14-18

- **Littérature 13 : Pesticides**

Ordonnance du DFI du 26 juin 1995 (état le 1er juillet 1995) sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC), RS 817.021.23, Annexe<sup>10</sup>

- **Littérature 14 : Mycètes (Levures-Moisissures) dans les aliments**

LACASSE D., Introduction à la microbiologie alimentaire, Levures, Moisissures, chapitre 2, Saint-Martin, Montréal, (2004), p112, p120 et p121

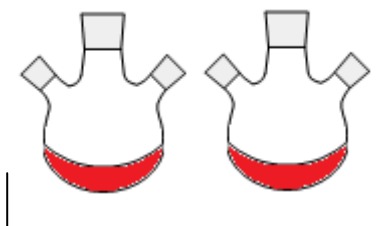
- **Littérature 15 : Eau potable**

Ordonnance du DFI du 23 novembre 2005 (état le 25 mai 2009) sur l'hygiène (OHyg), RS 817.024.1, Section B, Annexe 2<sup>78</sup>

## 9 ANNEXES

- [I] Mode opératoire pour les essais de pasteurisation
- [II] Table de la méthode NPP pour les diverses combinaisons de résultats positifs
- [III] Calculs et détails pour l'influence à court terme du ketchup sur la vitalité des souches
- [IV] Détails du suivi de l'évolution des spores et des végétatives de souche sauvage de *Bacillus cereus* (14.05.09) dans le ketchup
- [V] Détails du suivi de l'évolution des spores et des végétatives de souche sauvage provenant des épices (09.06.09) dans le ketchup
- [VI] Détails du suivi de l'évolution des spores et des végétatives de souche sauvage de *Bacillus cereus* (09.06.09) dans le ketchup
- [VII] Calculs et détails des essais de pasteurisation du ketchup avec *L. plantarum*
- [VIII] Calculs et détails des essais de pasteurisation du ketchup avec *S. typhimurium*
- [IX] Calculs et détails des essais de pasteurisation du ketchup avec *Z. baillii*
- [X] Calculs et détails des essais de pasteurisation du ketchup avec les spores isolés des épices
- [XI] Détails du pH pour l'influence du ketchup sur l'eau peptonée tamponnée, dans les conditions du dénombrement de la méthode du NPP
- [XII] Détails des valeurs obtenues pour la détermination de la viscosité du ketchup en fonction de la température
- [XIII] Arbre décisionnel recommandé par l'ICD, pour la détermination d'un danger
- [XIV] Arbre décisionnel ISO-22000 ProCert pour l'attribution des CCP et des oPRP
- [XV] Diagramme de fabrication du ketchup
- [XVI] Diagramme du conditionnement en squeezes
- [XVII] Taux de distribution de *Bacillus cereus* dans divers épices
- [XVIII] Diagramme de fabrication des sauces émulsionnées

**Annexe 1 : Mode opératoire pour les essais de pasteurisation**



Ballons 3 cols de 500 ml contenant 120g  $\pm$  5 g ketchup

Préchauffé 2 ballons à l'étuve selon la température à atteindre

Placer le ballon dans le bain de paraffine. Fixer le montage et mettre l'agitation. Attendre que la température du test soit atteinte. Disposer des sécurités sur les bouchons afin d'éviter qu'ils ne sautent

Pendant ce temps, préparer les tubes de bouillon et de VL (1 portoir pour l'échantillon à 3 min et un autre pour 6 minutes 40 secondes). Mettre les tubes Falcon sur glace. Préparer les pipettes, le thermomètre et le chronomètre.

Flamber l'encolure principal et ajouter 1 ml de la suspension bactérienne avec une micropipette stérile afin d'avoir au minimum  $10^7$  ufc/ml. Au moment de l'ajout, enclencher le chronomètre.

Flamber la sortie avant de prélever dans un tube Falcon stérile, un échantillon après 3 min et après 6 minutes 40 secondes, avec une pipette stérile de 10 ml. Remettre le tube sur glace

Placer l'obus magnétique dans une solution de désinfectant durant environ 1 min puis le flamber avec de l'éthanol avant de l'introduire dans un autre ballon.

Arrêter l'agitation, nettoyer le montage et recommencer la même opération avec le deuxième ballon.



**Annexe 2 : Table de la méthode NPP pour les diverses combinaisons de résultats positifs**

Nombre de résultats positifs			NP	Catégorie lorsque le nombre d'essais est de					Limites de confiance			
10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		1	2	3	5	10	> 95 %	> 95 %	> 99 %	> 99 %
0	0	0	< 0,30						0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	0	0,30	3	2	2	2	1	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	1	1	1	1	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	3	3	3	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	2	2	2	1	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0	0	0	3	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	1	1	1	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	2	1	1	1	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0	0	3	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	1	1	1	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	3	2	2	2	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	2	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	1	1	1	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	2	1	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2,0	0	3	3	3	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	1	1	1	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	2	1	1	1	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	1	1	1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0	0	0	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	1	1	1	1	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	1	1	1	1	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	3	2	2	2	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	1	1	1	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1	1	1	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	2	2	2	1	3	36	2	44
3	1	3	16	0	0	0	3	3	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1	1	1	1	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	1	1	1	1	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	1	1	1	1	3	40	2	56
3	2	3	29	3	3	3	2	2	9	99	5	152
3	3	0	24	1	1	1	1	1	4	99	3	152
3	3	1	46	1	1	1	1	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	1	1	1	1	20	400	10	570
3	3	3	>110									

Note : Les limites de confiance données dans le tableau B1 ne sont destinés qu'à fournir quelques notions de l'influence des variations statistiques sur les résultats. Il existera toujours d'autres sources de variations qui pourront, quelquefois, être importantes.

**Tableau 3 – Tableau B1 de l'annexe de la norme ISO 7218**

**Annexe 3 : Influence, à court terme, du ketchup sur la vitalité des souches**

Souches	Dénomination de l'échantillon	Date	Dilutions	Dénombrement (spirales)		Résultats [ufc/g]	Log(N <sub>F</sub> )	Log(N <sub>0</sub> )	Réductions [Valeur D]
				Analyse 1	Analyse 2				
<i>S.typhimurium</i>	N <sub>0</sub>	06.05.09	-8	•85/0.0492 ml	82/0.0492 ml	1.7E+11	-	11.23	-
	N <sub>F</sub> (1)	06.05.09	-7	69/0.0492 ml	56/0.0492 ml	1.3E+10	10.10		1.13
	N <sub>F</sub> (1')	06.05.09	-7	23/0.0492 ml	25/0.0492 ml	4.9E+09	9.69		1.54
	N <sub>F</sub> (2)	07.05.09	-5	30/0.0492 ml	30/0.0492 ml	6.1E+07	7.79		3.44
<i>Z.baillii</i>	N <sub>0</sub>	05.05.09	-7	45/0.0492 ml	42/0.0492 ml	8.8E+09	-	9.95	-
	N <sub>F</sub> (1)	05.05.09	-6	29/0.00457 ml	31/0.00457 ml	6.6E+09	9.82		0.13
	N <sub>F</sub> (2)	06.05.09	-6	33/0.0492 ml	34/0.0492 ml	6.8E+08	8.83		1.12
<i>L.plantarum</i>	N <sub>F</sub>	06.05.09	-8	83/0.0492 ml	69/0.0492 ml	1.5E+11	-	11.19	-
	N <sub>F</sub> (1)	06.05.09	-8	56/0.0492 ml	62/0.0492 ml	1.2E+11	11.08		0.11
	N <sub>F</sub> (2)	07.05.09	-7	49/0.0492 ml	51/0.0492 ml	1.0E+10	10.01		1.18

Nombre de réduction (Δ log): D = Log(N<sub>0</sub>) – log (N<sub>F</sub>)

**Exemple de calcul •** : N<sub>0</sub> = (((85+82)/2)/0.0492) x 10<sup>8</sup> = 1.7E+11 ufc/g



**Annexe 4 : Suivi de l'évolution des spores et des végétatives de souche sauvage de *Bacillus cereus* (14.05.09) dans le ketchup**

Suspension de spores	Dilutions	Dénombrement (en masse)		N <sub>o</sub> [ufc/ml]
<i>B. cereus</i> (14.05.09)	-6	68	76	7.2E+07

Dilution de la suspension de spores	Volume de prélèvement de la suspension de spores [μl]	Masse de ketchup [g]	No dans le ketchup [ufc/g]
-	50	302.47	1.2E+04

Jour prélèvement	Dilution	Dénombrement (en masse)		N <sub>o</sub> [ufc/g]	Log No
0	-3	42	44	4.3E+04	4.63

Jours de prélèvement	Dilutions	Dénombrement des spores (masse)		N <sub>f</sub> [ufc/g]	log N <sub>f</sub>
		Analyse 1	Analyse 2		
•1	-2	125	132	2.6E+04	4.41
4	-2	139	147	2.9E+04	4.46
6	-2	151	146	3.0E+04	4.47
11	-2	126	115	2.4E+04	4.38
12	-2	120	113	2.3E+04	4.37
14	-2	118	132	2.5E+04	4.40
19	-2	147	126	2.7E+04	4.44
22	-2	115	118	2.3E+04	4.37
27	-2	117	125	2.4E+04	4.38
33	-2	131	110	2.4E+04	4.38
35	-2	118	121	2.4E+04	4.38
39	-2	140	131	2.7E+04	4.43
41	-2	130	139	2.7E+04	4.43
44	-2	112	124	2.4E+04	4.37
55	-2	116	128	2.4E+04	4.39

Jours de prélèvement	Dilutions	Dénombrement des végétatives (masse)		N <sub>f</sub> [ufc/g]	log N <sub>f</sub>
		Analyse 1	Analyse 2		
*1	-3	26	22	2.4E+04	4.38
4	-3	29	27	2.8E+04	4.45
6	-3	23	25	2.4E+04	4.38
11	-3	25	23	2.4E+04	4.38
12	-3	29	27	2.8E+04	4.45
14	-3	26	27	2.7E+04	4.42
19	-3	24	28	2.6E+04	4.41
22	-3	27	25	2.6E+04	4.41
27	-3	21	25	2.3E+04	4.36
33	-3	25	24	2.5E+04	4.39
35	-3	26	25	2.6E+04	4.41
39	-3	28	31	3.0E+04	4.47
41	-3	24	21	2.3E+04	4.35
44	-3	21	27	2.4E+04	4.38
55	-3	32	19	2.6E+04	4.41

**Exemple de calcul •** :  $N_f = (125+132) \times 10^2 = 2.6E+04$  ufc/g

(Traitement à l'éthanol = dilution de 0.5)

**Exemple de calcul \*** :  $N_f = ((26+22)/2) \times 10^3 = 2.4E+04$  ufc/g

**Annexe 5 : Suivi de l'évolution des spores et des végétatives de souche sauvage provenant des épices (09.06.09) dans le ketchup**

Suspension de spores	Dilution	Dénombrement (en masse)		N <sub>o</sub> [ufc/ml]
Epices (09.06.09)	-8	61	60	6.1E+09

Dilution de la suspension de spores	Volume de prélèvement de la suspension de spores [µl]	Masse de ketchup [g]	No dans le ketchup [ufc/g]
100	50	305.18	1.0E+04

Jour prélèvement	Dilution	Dénombrement (en masse)		N <sub>o</sub> [ufc/g]	Log No
0	-3	18	22	2.0E+04	4.30

Jours de prélèvement	Dilutions	Dénombrement des spores (masse)		N <sub>f</sub> [ufc/g]	log N <sub>f</sub>
		Analyse 1	Analyse 2		
•1	-2	51	43	9.4E+03	3.97
4	-2	54	50	1.0E+04	4.02
6	-2	40	46	8.6E+03	3.93
11	-2	52	53	1.1E+04	4.02
12	-2	46	55	1.0E+04	4.00
14	-2	52	50	1.0E+04	4.01
19	-2	48	54	1.0E+04	4.01
22	-2	49	57	1.1E+04	4.03
27	-2	44	52	9.6E+03	3.98

Jours de prélèvement	Dilutions	Dénombrement des végétatives (masse)		N <sub>f</sub> [ufc/g]	log N <sub>f</sub>
		Analyse 1	Analyse 2		
*1	-2	88	82	8.5E+03	3.93
4	-2	105	110	1.1E+04	4.03
6	-2	95	97	9.6E+03	3.98
11	-2	99	97	9.8E+03	3.99
12	-2	90	96	9.3E+03	3.97
14	-2	95	102	9.9E+03	3.99
19	-2	93	110	1.0E+04	4.01
22	-2	98	106	1.0E+04	4.01
27	-2	94	97	9.6E+03	3.98

**Exemple de calcul •** :  $N_f = (51+43) \times 10^2 = 9.4E+03$  ufc/g

(Traitement à l'éthanol = dilution de 0.5)

**Exemple de calcul \*** :  $N_f = ((88+82)/2) \times 10^2 = 8.5E+03$  ufc/g

**Annexe 6 : Suivi de l'évolution des spores et des végétatives de souche sauvage de *Bacillus cereus* (09.06.09) dans le ketchup**

Suspension de spores	Dilution	Dénombrement (en masse)		N <sub>o</sub> [ufc/ml]
<i>B. cereus</i> (09.06.09)	-7	62	69	6.6E+08

Dilution de la suspension de spores	Volume de prélèvement de la suspension de spores [μl]	Masse de ketchup [g]	No dans le ketchup [ufc/g]
10	50	298.93	1.1E+04

Jour prélèvement	Dilution	Dénombrement (en masse)		N <sub>o</sub> [ufc/g]	Log No
0	-3	78	64	7.1E+04	4.85

Jours de prélèvement	Dilutions	Dénombrement des spores (masse)		N <sub>f</sub> [ufc/g]	log N <sub>f</sub>
		Analyse 1	Analyse 2		
•1	-3	30	31	6.1E+04	4.79
4	-3	26	29	5.5E+04	4.74
6	-3	32	36	6.8E+04	4.83
11	-3	29	34	6.3E+04	4.80
12	-3	31	35	6.6E+04	4.82
14	-3	27	30	5.7E+04	4.76
19	-3	32	28	6.0E+04	4.78
22	-3	26	31	5.7E+04	4.76
27	-3	29	33	6.2E+04	4.79

Jours de prélèvement	Dilutions	Dénombrement des végétatives (masse)		N <sub>f</sub> [ufc/g]	log N <sub>f</sub>
		Analyse 1	Analyse 2		
*1	-3	60	57	5.9E+04	4.77
4	-3	71	65	6.8E+04	4.83
6	-3	60	69	6.5E+04	4.81
11	-3	55	61	5.8E+04	4.76
12	-3	63	70	6.7E+04	4.82
14	-3	63	67	6.5E+04	4.81
19	-3	57	64	6.1E+04	4.78
22	-3	56	60	5.8E+04	4.76
27	-3	58	66	6.2E+04	4.79

**Exemple de calcul •** :  $N_f = (30+31) \times 10^3 = 6.1E+04$  ufc/g

(Traitement à l'éthanol = dilution de 0.5)

**Exemple de calcul \*** :  $N_f = ((60+57)/2) \times 10^3 = 5.9E+04$  ufc/g

**Annexe 7 : Essais de pasteurisation du ketchup avec *Lactobacillus plantarum***

	Suspension bactérienne	Dilution	Dénombrement (spirale)		N <sub>o</sub> [ufc/ml]
1	<i>L.plantarum</i>	-6	92	95	1.90E+09
No de la suspension bactérienne [ufc/ml]		1.90E+09			
Température		50°C	55°C	60°C	85°C
Masse de ketchup [g]		121.23	120.25	122.92	120.20
		120.62	120.20	120.37	120.03
		121.36	120.54	123.13	120.52
		120.55	120.01	120.18	120.55

2	Températures	No dans le ketchup [ufc/g]	log(No)
	50°C	1.57E+07	7.20
		1.57E+07	7.19
		1.58E+07	7.20
		1.58E+07	7.20
	Moyenne	1.57E+07	7.20
	55°C	1.58E+07	7.20
		1.58E+07	7.20
		1.58E+07	7.20
		1.58E+07	7.20
	Moyenne	1.58E+07	7.20
	60°C	1.55E+07	7.19
		1.54E+07	7.19
		1.58E+07	7.20
		1.58E+07	7.20
	Moyenne	1.56E+07	7.19
	85°C	1.58E+07	7.20
		1.58E+07	7.20
		1.58E+07	7.20
		1.58E+07	7.20
	Moyenne	1.58E+07	7.20

3''	Températures	Temps	*N <sub>F</sub> [ufc/g] / NPP [NPP/g]	log (N <sub>F</sub> ) / log (NPP)
50°C		3 min (1)*	1.66E+05	5.22
		3 min (2)*	1.55E+05	5.19
		3 min (3)*	1.57E+05	5.20
		3 min (4)*	1.74E+05	5.24
		Moyenne*	1.63E+05	5.21
		6 min 40 s (1)*	1.69E+04	4.23
		6 min 40 s (2)*	1.58E+04	4.20
		6 min 40 s (3)*	1.88E+04	4.27
55°C		6 min 40 s (4)*	1.42E+04	4.15
		Moyenne*	1.64E+04	4.22
		3 min (1)	9.30	0.97
		3 min (2)	9.30	0.97
		3 min (3)	15.00	1.18
		3 min (4)	9.30	0.97
		Moyenne	10.73	1.03
		6 min 40 s (1)	<0.3	< -0.52
60°C/85°C		6 min 40 s (2)	<0.3	< -0.52
		6 min 40 s (3)	<0.3	< -0.52
		6 min 40 s (4)	<0.3	< -0.52
		Moyenne	< 0.3	< -0.52
		3 min (1,2)	<0.3	< -0.52
		3 min (3,4)	<0.3	< -0.52
		Moyenne	< 0.3	< -0.52
		6 min 40 s (1,2)	<0.3	< -0.52
		6 min 40 s (3,4)	<0.3	< -0.52
		Moyenne	< 0.3	< -0.52

**Exemple de calcul :**

N<sub>o</sub> dans le ketchup = 1.90E+09/121.23 = 1.57E+07 ufc/g  
 3min(1)\* = ((176+156)/2) x 10 x 10<sup>2</sup> = 1.66E+05 ufc/g  
 Nombre de réduction (Δ log): D = Log(N<sub>o</sub>) – log (N<sub>F</sub>)

3'	50°C	Dilutions	Dénombrement a)		Résultats [ufc/g]
			Analyse 1	Analyse 2	
	3 min (1)*	-2	176	156	1.66E+05
	3 min (2)*	-2	145	165	1.55E+05
	3 min (3)*	-2	153	161	1.57E+05
	3 min (4)*	-2	178	169	1.74E+05
	6 min 40 s (1)*	-1	167	171	1.69E+04
	6 min 40 s (2)*	-1	140	176	1.58E+04
	6 min 40 s (3)*	-1	180	196	1.88E+04
	6 min 40 s (4)*	-1	126	157	1.42E+04

a)Dénombrement en surface

4	Températures	Temps	Réductions [Valeur D]
50°C		3min	1.98
		6 min 40 s	2.98
55°C		3min	6.17
		6 min 40 s	>7.72
60°C		3min	>7.72
		6 min 40 s	>7.72
85°C		3min	>7.72
		6 min 40 s	>7.72

3						
50°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
55°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	3	2	0	9.3 NPP/g	9.3 NPP/g
		3	2	0	9.3 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	3	2	1	15 NPP/g	12.2 NPP/g
		3	2	0	9.3 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
60°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
85°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	

- 1 :  $N_0$  de la suspension bactérienne et masse de ketchup utilisée pour les essais
- 2 :  $N_0$  et log  $N_0$  effectif dans le ketchup
- 3 : Résultats du dénombrement selon la méthode du NPP
- 3' : Résultats du dénombrement selon la méthode du décompte sur gélose
- 3'' : log  $N_F$  et log NPP en fonction des températures testées
- 4 : Réductions obtenues en fonction du temps et de la température de pasteurisation

**Annexe 8 : Essais de pasteurisation du ketchup avec *Salmonella typhimurium***

Suspension bactérienne	Dilution	Dénombrement (spirale)		N <sub>o</sub> [ufc/ml]
<i>S.typhimurium</i>	-8	171	190	3.67+11

1	3.67E+11							
No de la suspension bactérienne [ufc/ml]								
Température	50°C	55°C	60°C	85°C	50°C	55°C	60°C	85°C
Masse de ketchup [g]	120.08	122.41	120.56	120.67	120.29	120.69	120.52	120.64
	120.52	124.69	120.57	120.44	120.36	120.94	120.87	120.37

2		
Températures	No dans le ketchup[ufc/g]	log(No)
50°C	3.06E+09	9.49
	3.05E+09	9.48
	3.05E+09	9.48
	3.05E+09	9.48
Moyenne	3.05E+09	9.48
55°C	3.00E+09	9.48
	2.94E+09	9.47
	3.04E+09	9.48
	3.03E+09	9.48
Moyenne	3.00E+09	9.48
60°C	3.04E+09	9.48
	3.04E+09	9.48
	3.05E+09	9.48
	3.04E+09	9.48
Moyenne	3.04E+09	9.48
85°C	3.04E+09	9.48
	3.05E+09	9.48
	3.04E+09	9.48
	3.05E+09	9.48
Moyenne	3.04E+09	9.48

3'			
Températures	Temps	NPP [NPP/g]	log (NPP)
50°C	3 min (1)	15.00	1.18
	3 min (2)	110.00	2.04
	3 min (3)	2.30	0.36
	3 min (4)	2.30	0.36
	Moyenne	32.40	1.51
	6 min 40 s (1)	<0.3	<-0.52
	6 min 40 s (2)	<0.3	<-0.52
	6 min 40 s (3)	<0.3	<-0.52
	6 min 40 s (4)	<0.3	<-0.52
	Moyenne	<0.3	<-0.52
55°C/60°C/85°C	3 min (1)	<0.3	<-0.52
	3 min (2)	<0.3	<-0.52
	3 min (3)	<0.3	<-0.52
	3 min (4)	<0.3	<-0.52
	Moyenne	<0.3	<-0.52
	6 min 40 s (1)	<0.3	<-0.52
	6 min 40 s (2)	<0.3	<-0.52
	6 min 40 s (3)	<0.3	<-0.52
	6 min 40 s (4)	<0.3	<-0.52
	Moyenne	<0.3	<-0.52

4		
Températures	Temps	Réductions [Valeur D]
50°C	3min	7.97
	6 min 40 s	>10.01
55°C	3min	>10.00
	6 min 40 s	>10.00
60°C	3min	>10.01
	6 min 40 s	>10.01
85°C	3min	>10.01
	6 min 40 s	>10.01

**Exemple de calcul :**

N<sub>o</sub> dans le ketchup = 3.67E+11/120.08 = 3.06E+09 ufc/g  
 Nombre de réduction (Δ log) : D = Log(N<sub>o</sub>) – log (N<sub>f</sub>)

3						
50°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	3	2	1	15 NPP/g	62.5 NPP/g
		3	3	2	110 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	< 0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	3	0	0	2.3 NPP/g	2.3 NPP/g
		3	0	0	2.3 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	< 0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
55°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
60°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
85°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	

- 1 :  $N_0$  de la suspension bactérienne et masse de ketchup utilisée pour les essais
- 2 :  $N_0$  et log  $N_0$  effectif dans le ketchup
- 3 : Résultats du dénombrement selon la méthode du NPP
- 3' : Résultats du dénombrement selon la méthode du décompte sur gélose
- 3'' : log  $N_F$  et log NPP en fonction des températures testées
- 4 : Réductions obtenues en fonction du temps et de la température de pasteurisation

**Annexe 9 : Essais de pasteurisation du ketchup avec *Zygosaccharomyces baillii***

Suspension bactérienne	Dilution	Dénombrement (spirale)		N <sub>o</sub> [ufc/ml]
<i>Z.baillii</i>	-7	29	35	6.50+09

1

No de la suspension bactérienne [ufc/ml]	6.50E+09							
Température	50°C	55°C	60°C	85°C	50°C	55°C	60°C	85°C
Masse de ketchup [g]	121.44	124.64	120.46	121.96	120.27	120.08	120.23	120.39
	120.69	124.31	120.87	121.33	120.66	120.58	120.15	120.87

2

Températures	No dans le ketchup [ufc/g]	log(No)
50°C	5.36E+07	7.73
	5.39E+07	7.73
	5.41E+07	7.73
	5.40E+07	7.73
Moyenne	5.39E+07	7.73
55°C	5.22E+07	7.72
	5.24E+07	7.72
	5.42E+07	7.73
	5.40E+07	7.73
Moyenne	5.32E+07	7.73
60°C	5.40E+07	7.73
	5.39E+07	7.73
	5.41E+07	7.73
	5.42E+07	7.73
Moyenne	5.41E+07	7.73
85°C	5.34E+07	7.73
	5.37E+07	7.73
	5.41E+07	7.73
	5.39E+07	7.73
Moyenne	5.37E+07	7.73

3''

Températures	Temps	*N <sub>F</sub> [ufc/g] / NPP[NPP/g]	log (NPP/ log (N <sub>F</sub> ))
50°C	3 min (1)*	1.69E+07	7.23
	3 min (2)*	2.63E+07	7.42
	3 min (3)*	1.93E+07	7.29
	3 min (4)*	2.51E+07	7.40
	Moyenne*	2.19E+07	7.34
	6 min 40 s (1)*	1.08E+07	7.03
	6 min 40 s (2)*	1.68E+07	7.23
	6 min 40 s (3)*	1.08E+07	7.03
	6 min 40 s (4)*	1.39E+07	7.14
	Moyenne*	1.31E+07	7.12
55°C	3 min (1)	110.00	2.04
	3 min (2)	24.00	1.38
	3 min (3)	46.00	1.66
	3 min (4)	24.00	1.38
	Moyenne	51.00	1.71
	6 min 40 s (1)	15.00	1.18
	6 min 40 s (2)	7.50	0.88
	6 min 40 s (3)	21.00	1.32
	6 min 40 s (4)	15.00	1.18
	Moyenne	14.63	1.17
60°C/85°C	3 min (1,2)	<0.3	<-0.52
	3 min (3,4)	<0.3	<-0.52
	Moyenne	<0.3	<-0.52
	6 min 40 s (1,2)	<0.3	<-0.52
	6 min 40 s (3,4)	<0.3	<-0.52
	Moyenne	<0.3	<-0.52

**Exemple de calcul :**

N<sub>o</sub> dans le ketchup = 6.51E+09/121.44 = 5.36E+07 ufc/g  
 3min(1)\* = ((193+144)/2) x 10 x 10<sup>4</sup> = 1.69E+07 ufc/g  
 Nombre de réduction (Δ log): D = Log(N<sub>o</sub>) – log (N<sub>F</sub>)

3'

50°C	Dilutions	Dénombrement a)		Résultats [ufc/g]
		Analyse 1	Analyse 2	
3 min (1)*	-4	193	144	1.69E+07
3 min (2)*	-4	259	267	2.63E+07
3 min (3)*	-4	186	199	1.93E+07
3 min (4)*	-4	247	254	2.51E+07
6 min 40 s (1)*	-4	100	116	1.08E+07
6 min 40 s (2)*	-4	140	196	1.68E+07
6 min 40 s (3)*	-4	109	107	1.08E+07
6 min 40 s (4)*	-4	135	143	1.39E+07

a) Dénombrement en surface

4

Températures	Temps	Réductions [Valeur D]
50°C	3min	0.39
	6 min 40 s	0.62
55°C	3min	6.02
	6 min 40 s	6.56
60°C	3min	>8.26
	6 min 40 s	>8.26
85°C	3min	>8.25
	6 min 40 s	>8.25



3						
50°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
55°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	3	3	2	110 NPP/g	67 NPP/g
		3	3	0	24 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	3	2	1	15 NPP/g	11.3 NPP/g
		3	1	1	7.5 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	3	3	1	46 NPP/g	35 NPP/g
		3	3	0	24 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	3	2	1	15 NPP/g	15 NPP/g
		3	2	1	15 NPP/g	
60°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
85°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (1,2)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
Tubes positifs	3 min (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	
	6 min 40 s (3,4)	0	0	0	<0.3 NPP/g	<0.3 NPP/g
		0	0	0	<0.3 NPP/g	

- 1 :  $N_0$  de la suspension bactérienne et masse de ketchup utilisée pour les essais
- 2 :  $N_0$  et log  $N_0$  effectif dans le ketchup
- 3 : Résultats du dénombrement selon la méthode du NPP
- 3' : Résultats du dénombrement selon la méthode du décompte sur gélose
- 3'' : log  $N_F$  et log NPP en fonction des températures testées
- 4 : Réductions obtenues en fonction du temps et de la température de pasteurisation

**Annexe 10 : Essais de pasteurisation du ketchup avec les spores isolés des épices**

No suspension de spores isolé du poivre [ufc/ml]	6.05E+09
Masse de ketchup [g]	124.07
Volume de suspension ajouté au ketchup [ml]	2
No dans le ketchup [ufc/g]	9.75E+07
Log No dans le ketchup	7.99

85°C		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	NPP/g	Moyenne NPP/g
Tubes positifs	3 min (1)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
		3	3	3	>110 NPP/g	
	3 min (2)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
		3	3	3	>110 NPP/g	
	6 min 40 s (1)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
		3	3	3	>110 NPP/g	
	6 min 40 s (2)	3	3	3	>110 NPP/g	>110 NPP/g
		3	3	3	>110 NPP/g	
		3	3	3	>110 NPP/g	

85°C	Dilutions	Dénombrement (masse)		Résultats [ufc/g]
		Analyse 1	Analyse 2	
3 min (1)	-6	37	32	3.45E+07
3 min (2)	-6	44	37	4.05E+07
6 min 40 s (1)	-5	150	181	1.66E+07
6 min 40 s (2)	-5	178	164	1.71E+07

Temps	N <sub>F</sub> [ufc/g]	log (N <sub>F</sub> )
3 min (1)	3.45E+07	7.54
3 min (2)	4.05E+07	7.61
Moyenne	3.75E+07	7.57
6 min 40 s (1)	1.66E+07	7.22
6 min 40 s (2)	1.68E+07	7.23
Moyenne	1.67E+07	7.22

Températures	Temps	Réductions [Valeur D]
85°C	3 min	0.42
	6 min 40 s	0.77

**Exemple de calcul :**

$N_o$  dans le ketchup =  $(6.05E+09 \times 2) / 124.07 = 9.75E+07$  ufc/g

$3min(1) = ((37+32)/2) \times 10^6 = 3.45E+07$  ufc/g

Nombre de réduction ( $\Delta$  log):  $D = \text{Log}(N_o) - \text{log}(N_F)$

**Annexe 11 : Influence du ketchup sur l'eau peptonée tamponnée, dans les conditions du dénombrement de la méthode du NPP**

<b>Ketchup chauffé à 50°C</b>				
Solution -dilution	Analyse 1	Analyse 2	Analyse 3	Moyenne
<b>BPW 0</b>	6.32	6.31	6.32	6.32
<b>VL -1</b>	4.05	4.05	4.04	4.05
<b>VL -2</b>	4.65	4.66	4.65	4.65

<b>Ketchup à température ambiante</b>				
Solution -dilution	Analyse 1	Analyse 2	Analyse 3	Moyenne
<b>BPW 0</b>	6.34	6.35	6.35	6.35
<b>VL -1</b>	4.05	4.05	4.05	4.05
<b>VL -2</b>	4.66	4.65	4.66	4.66

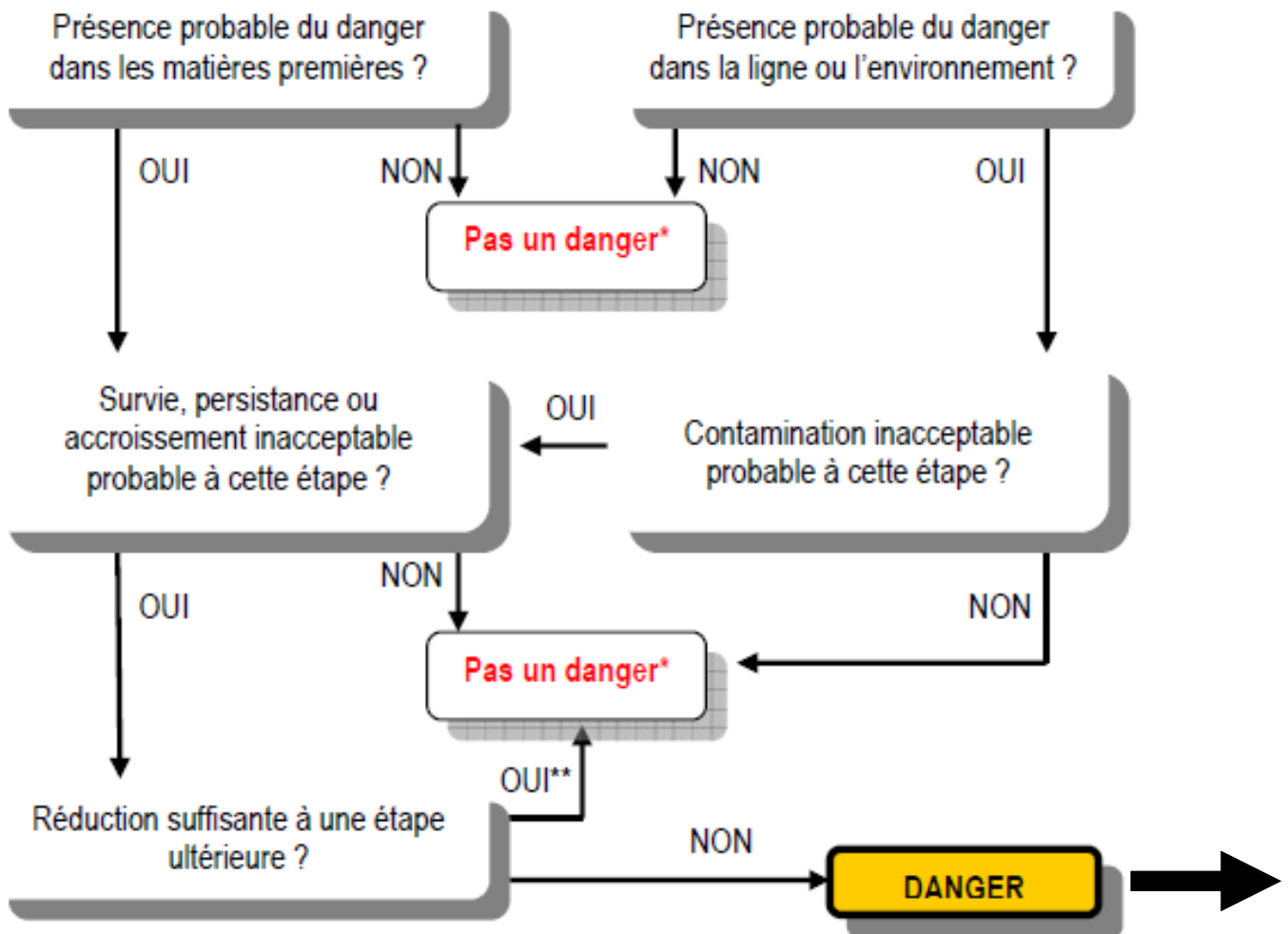
**Annexe 12 : Détermination de la viscosité du ketchup en fonction de la température**

Températures [°C]	Viscosités [Pa*s]	Taux de cisaillement [s <sup>-1</sup> ]	Températures [°C]	Viscosités [Pa*s]	Taux de cisaillement [s <sup>-1</sup> ]
20.80	6.01	5	20.90	2.26	20
24.80	5.83		24.70	2.27	
30.00	5.59		29.70	2.2	
34.60	5.29		34.70	2.1	
39.70	4.91		39.80	2	
44.60	4.61		44.80	1.9	
50.20	4.17		49.90	1.79	
55.20	3.86		55.00	1.67	
60.30	3.61		60.20	1.6	
65.20	3.4		65.20	1.53	
70.10	3.19		69.90	1.48	
75.10	2.98		75.00	1.42	
80.00	2.77		80.00	1.37	
85.00	2.59		84.90	1.33	
90.00	2.43		90.00	1.29	
Températures [°C]	Viscosités [Pa*s]	Taux de cisaillement [s <sup>-1</sup> ]	Températures [°C]	Viscosités [Pa*s]	Taux de cisaillement [s <sup>-1</sup> ]
20.60	0.91	80	20.70	0.68	140
24.60	0.93		24.60	0.7	
29.60	0.89		29.70	0.66	
34.80	0.84		34.80	0.61	
39.60	0.79		39.60	0.57	
44.70	0.74		44.70	0.53	
50.20	0.69		50.20	0.48	
55.10	0.64		55.20	0.45	
60.30	0.6		60.00	0.42	
65.00	0.57		65.00	0.4	
70.10	0.54		70.00	0.38	
75.10	0.51		75.00	0.36	
79.90	0.51		80.00	0.35	
85.00	0.49		84.90	0.33	
90.00	0.48		90.00	0.32	

Températures [°C]	Viscosités [Pa*s]	Taux de cisaillement [s <sup>-1</sup> ]
20.20	0.34	500
24.70	0.34	
29.70	0.32	
34.50	0.3	
39.60	0.27	
44.60	0.25	
49.80	0.23	
55.00	0.21	
60.20	0.2	
64.90	0.19	
70.10	0.18	
75.00	0.17	
80.00	0.16	
84.90	0.16	
90.00	0.15	

**Annexe 13 : Arbre décisionnel recommandé par l'ICD**

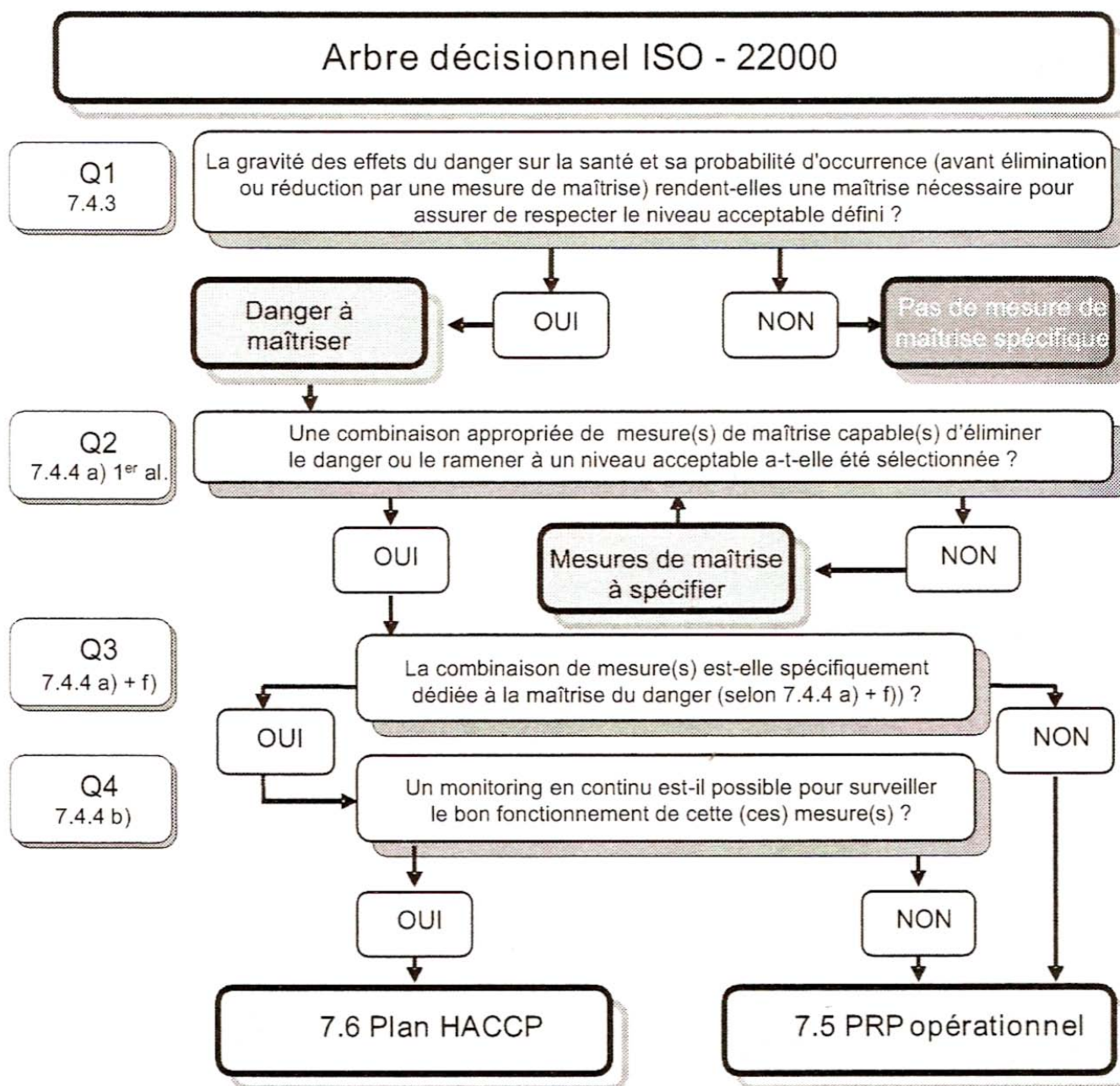
## 6 a) Identification des dangers



\* Pas un danger qui demande à être maîtrisé à cette étape

\*\* L'étape ultérieure permettant la réduction sera un CCP

**Annexe 14 : Arbre décisionnel ISO-22000 ProCert pour l'attribution des CCP et des oPRP**



**Figure 3.14 Arbre décisionnel ISO 22000 ProCert**

<b>Annexe 15 : Diagramme de fabrication du ketchup</b>
--

- Données confidentielles

<b>Annexe 16 : Diagramme de conditionnement en squeezes</b>
---

- Données confidentielles



**Annexe 17 : Taux de distribution *B.cereus* dans divers épices**

Spice	No. of Samples	Percentage Distribution of <i>Bacillus cereus</i> Counts g <sup>-1</sup> <sup>a</sup>				
		<1.0 E2 <sup>b</sup>	1.0 E2 to 9.9 E2	1.0 E3 to 9.9 E3	1.0 E4 to 9.9 E4	1.0 E5 to 9.9 E5
Allspice/pimento	8	25	38	37		
Capsicum (chili)	21	70	10	10	10	
Chives	11	100				
Cinnamon	36	42	14	39	5	
Cloves	23	100				
Coriander seed	11	82	18			
Cumin seed	15	13	27	33	20	7
Fenugreek seed	14	57	15	21	7	
Garlic	21	67	23	10		
Ginger	35	20	23	54	3	
Mace	22	18	14	64	4	
Mint flakes	3	0	0	100		
Mustard seed	4	50	50			
Nutmeg	33	76	21	3		
Onion powder	13	77	15	0	8	
Oregano	7	57	0	14	29	
Paprika	32	62	19	19		
Parsley flakes	6	83	17			
Pepper, black	97	19	8	56	16	1
Pepper, white	66	48	17	33	2	
Turmeric	22	50	18	22	5	5

<sup>a</sup>Detection limit: 10<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup>E2 = 10 exponential 2 = 10<sup>2</sup>.

Source: Adapted with permission from J. Pafumi, Assessment of the Microbiological Quality of Spices and Herbs, *Journal of Food Protection*, Vol. 49, pp. 958–963, © 1986, International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, Inc. (IAMFES).

**Annexe 18 : Diagramme de fabrication des sauces émulsionnées**

- Données confidentielles